

**IMPACTOS DA RAÇÃO AUTOCLAVADA NO CRESCIMENTO, MORFOLOGIA
INTESTINAL E PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM MACRÓFAGOS
PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS SWISS E BALB/c NUDE**

HIGOR ALMEIDA CORDEIRO NOGUEIRA

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF

Campos dos Goytacazes - RJ

Fevereiro de 2024

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

N778

Nogueira, Higor Almeida Cordeiro.

IMPACTOS DA RAÇÃO AUTOCLAVADA NO CRESCIMENTO, MORFOLOGIA INTESTINAL E PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS SWISS E BALB/c NUDE / Higor Almeida Cordeiro Nogueira. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2024.

48 f.

Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2024.

Orientador: Clovis de Paula Santos.

1. Autoclavagem. 2. Desempenho zootécnico. 3. Macrófagos. 4. Morfologia intestinal. 5. Nutrição. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

**IMPACTOS DA RAÇÃO AUTOCLAVADA NO CRESCIMENTO, MORFOLOGIA
INTESTINAL E PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM MACRÓFAGOS
PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS SWISS E BALB/c NUDE**

HIGOR ALMEIDA CORDEIRO NOGUEIRA

Dissertação apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biociências da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das
exigências para obtenção do título de
Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Clóvis de Paula Santos

Campos dos Goytacazes - RJ

Fevereiro de 2024

**IMPACTOS DA RAÇÃO AUTOCLAVADA NO CRESCIMENTO, MORFOLOGIA
INTESTINAL E PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM MACRÓFAGOS
PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS SWISS E BALB/c NUDE**

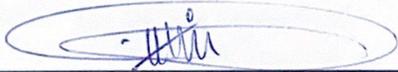
HIGOR ALMEIDA CORDEIRO NOGUEIRA

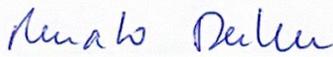
Dissertação apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biociências da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das
exigências para obtenção do título de
Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Aprovada em 26 de fevereiro de 2024.

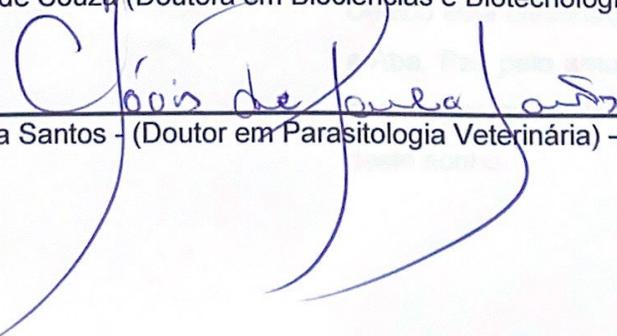
Banca examinadora:


Adolpho M. Antoniol de Moura (Doutor em Ciência Animal) – FIOCRUZ/UENF


Eulógio Carlos Queiroz Carvalho (Doutor em Patologia) – UENF


Renato Augusto DaMatta (Doutor em Ciências Biológicas) – UENF


Thais Louvain de Souza (Doutora em Biociências e Biotecnologia) – FMC


Clóvis de Paula Santos (Doutor em Parasitologia Veterinária) – UENF (Orientador)

Dedico esta dissertação à minha família e a Aba, Pai, pelo amor e suporte ao longo das etapas que culminaram na realização deste sonho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por cada etapa dessa jornada. A maneira como tudo foi conduzido reflete a presença do Senhor, Aquele que já me concedeu muito mais do que pedi e que fará muito além do que jamais imaginei.

Expresso minha gratidão à minha mãe, Edinea Almeida Cordeiro Nogueira, por todo o apoio. Sem o seu suporte, jamais alcançaria o ponto em que me encontro. Nossa família deve tudo aos seus esforços, que nos mantiveram unidos durante os períodos mais difíceis.

Agradeço também ao meu pai, Carlos Alberto Marques Nogueira, pela inspiradora trajetória de vida que moldou o sonhador que sou hoje. Você é minha fonte de inspiração e a razão para nunca desistir.

Minha gratidão se estende ao meu irmão, Yuri Almeida Cordeiro Nogueira, por sua amizade e companheirismo. Sua vida me ensinou o verdadeiro significado de estar disposto a fazer tudo por alguém.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Clóvis de Paula Santos, pela oportunidade singular de ingressar no mestrado. O início de minha jornada só foi possível graças a sua confiança. Agradeço imensamente por todo suporte.

Estendo meus agradecimentos ao Dr. Adolpho Marlon Antoniol de Moura, pela oportunidade de participar de sua linha de pesquisa, pelos ensinamentos e, também, companheirismo dentro e fora da vida acadêmica.

Gratidão ao técnico do biotério central, Maurício de Oliveira Atayde, por todo o acolhimento. Seus conselhos e dicas facilitaram minha trajetória.

Não posso deixar de agradecer ao Prof. Dr. Renato Augusto DaMatta pelas ideias durante a defesa do projeto e por todo suporte nas análises realizadas em seu laboratório.

Meus agradecimentos também ao Dr. Pedro Souto Rodrigues por seu apoio na coleta e análise dos macrófagos peritoneais.

Agradeço ao Prof. Dr. Eulógio Carlos Queiroz Carvalho e a todo o seu laboratório pela ajuda no processamento das amostras intestinais e análises das lâminas histológicas.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, minha sincera gratidão pela oportunidade de realizar este sonho.

À CAPES, expresso minha gratidão pela bolsa de mestrado e por todo investimento em prol da ciência.

Por fim, agradeço a todos que fizeram parte desta jornada, tanto de forma direta quanto indireta. Vocês influenciaram a minha chegada até este ponto.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1. ANIMAIS DE LABORATÓRIO	14
2.2. ROEDORES DE LABORATÓRIO	15
2.3. ASPECTOS NUTRICIONAIS DE ROEDORES DE LABORATÓRIO	17
2.4. DIETAS PARA ROEDORES DE LABORATÓRIO	19
2.5. MÉTODOS DE ESTERILIZAÇÃO DA DIETA	21
2.6. SISTEMA IMUNOLÓGICO DOS ROEDORES	22
3. OBJETIVOS	24
3.1. OBJETIVO GERAL	24
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1. ASPECTOS ÉTICOS	24
4.2. MODELOS ANIMAIS	24
4.3. AMBIENTE EXPERIMENTAL	25
4.4. INSTALAÇÕES DO BIOTÉRIO	26
4.5. TRATAMENTO	26
4.6. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	27
4.7. DESEMPENHO DE CRESCIMENTO	28
4.8. AVALIAÇÃO DA CONVERSÃO ALIMENTAR	28
4.9. COLETA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS	28
4.10. ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO	28
4.11. ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA INTESTINAL	29
4.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
5. RESULTADOS	31
5.1. DESEMPENHO DE CRESCIMENTO	31
5.2. CONVERSÃO ALIMENTAR	34
5.3. PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)	35
5.4. HISTOMORFOMETRIA DAS VILOSIDADES E CRIPTAS INTESTINAIS	36
6. DISCUSSÃO	38
7. CONCLUSÃO	41

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - O Instituto Wistar, fundado como museu de ensino de anatomia em 1892, desenvolveu o rato Wistar, um dos primeiros modelos padronizados de roedores. **15**
- Figura 2** - Roedores mais utilizados na pesquisa científica. **16**
- Figura 3** - Modelos animais utilizados. **25**
- Figura 4** - Ordem cronológica das etapas experimentais. **25**
- Figura 5** - Método de esterilização da ração. **27**
- Figura 6** - Medição (μm) da altura das vilosidades e profundidade das criptas intestinais com a ferramenta de linha reta do Leica Application Suite (LAS) (Ampliação: 100 \times). **30**
- Figura 7** - Ganho de peso corporal de camundongos Swiss durante quatro semanas. **31**
- Figura 8** - Ganho de peso corporal de camundongos BALB/c Nude durante quatro semanas. **32**
- Figura 9** - Produção de NO em macrófagos peritoneais de camundongos Swiss. **35**
- Figura 10** - Produção de NO em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c Nude. **36**
- Figura 11** - Mensuração da altura das vilosidades e profundidade de criptas intestinais de camundongos Swiss. **37**
- Figura 12** - Mensuração da altura das vilosidades e profundidade de criptas intestinais de camundongos BALB/c Nude. **24**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados biológicos e zootécnicos de roedores de laboratório.	17
Tabela 2 - Resumo da composição nutricional das formulações AIN-93G e AIN-93M.	20
Tabela 3 - Composição nutricional da ração comercial para roedores de laboratório.	26
Tabela 4 - Peso médio dos animais e respectivos grupos.	27
Tabela 5 - Consumo total de ração dos camundongos Swiss durante quatro semanas.	33
Tabela 6 - Consumo total de ração dos camundongos BALBc/ Nude durante quatro semanas.	33
Tabela 7 - Conversão alimentar dos camundongos Swiss.	34
Tabela 8 - Conversão alimentar dos camundongos BALB/c Nude.	34

RESUMO

A nutrição desempenha um papel crucial no desempenho zootécnico, saúde e bem-estar dos roedores de laboratório. No entanto, pouco se sabe sobre o impacto dos métodos de esterilização da dieta na fisiologia dos animais. Este estudo investigou os efeitos da autoclavagem em rações peletizadas no desempenho de crescimento, consumo alimentar, conversão alimentar, atividade de macrófagos peritoneais e morfologia intestinal em camundongos Swiss e BALB/c Nude. Durante o período experimental de quatro semanas, não foram observadas diferenças significativas no ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar entre os grupos alimentados com ração autoclavada e não autoclavada, indicando que a autoclavagem não prejudicou o desempenho zootécnico dos roedores de laboratório. No entanto, uma maior produção de óxido nítrico foi observada nos macrófagos peritoneais dos camundongos alimentados com ração autoclavada, sugerindo um potencial influência deste método de esterilização da dieta na atividade imunológica dos animais. Além disso, a análise histomorfométrica revelou alterações na morfologia intestinal, com vilosidades mais longas e criptas mais rasas em camundongos que consumiram ração autoclavada indicando que a modificação na composição nutricional da dieta pode influenciar no tamanho das células intestinais. Destacamos a importância de futuras investigações, especialmente considerando a avaliação em diversas espécies e linhagens de roedores de laboratório, além de investigar a possível influência da autoclavagem nos resultados experimentais.

Palavras-chave: Animais de laboratório; Autoclavagem; Desempenho zootécnico; Esterilização da dieta; Macrófagos; Morfologia intestinal; Nutrição.

ABSTRACT

Nutrition plays a crucial role in the zootechnical performance, health, and well-being of laboratory rodents. However, little is known about the impact of dietary sterilization methods on animal physiology. This study investigated the effects of autoclaving pelleted feed on growth performance, feed intake, feed conversion, peritoneal macrophage activity and intestinal morphology in Swiss and BALB/c Nude mice. During the four-week experimental period, no significant differences were observed in weight gain, feed consumption and feed conversion between the groups fed autoclaved and non-autoclaved feed, indicating that autoclaving did not harm the zootechnical performance of laboratory rodents. However, a greater production of nitric oxide was observed in the peritoneal macrophages of mice fed autoclaved food, suggesting a potential influence of this method of dietary sterilization on the animals' immunological activity. Furthermore, histomorphometric analysis revealed changes in intestinal morphology, with longer villi and shallower crypts in mice that consumed autoclaved food, indicating that changes in the nutritional composition of the diet can influence the size of intestinal cells. We highlight the importance of future investigations, especially considering the evaluation in distinct species and strains of laboratory rodents, in addition to investigating the possible influence of autoclaving on experimental results.

Keywords: Autoclaving; Diet sterilization; Intestinal morphology. Laboratory animals; Macrophages; Nutrition; Zootechnical performance.

1. INTRODUÇÃO

O uso de ratos e camundongos na pesquisa biomédica remonta ao século XVI, com o desenvolvimento dos primeiros modelos padronizados de roedores para laboratórios no início do século XX (KING H, 1915). Nas últimas décadas, centenas de linhagens desses animais foram desenvolvidas, cada uma com perfis genéticos distintos. Devido às suas características, como tamanho reduzido, prole numerosa, facilidade de manuseio e relação custo-benefício favorável, esses modelos tornaram-se os mais utilizados em diversas áreas da pesquisa biomédica, como genética, oncologia e imunologia (BRYDA, 2013; GUÉNET; ORTH; BONHOMME, 2012).

O cuidado com os roedores de laboratório é essencial, tanto do ponto de vista ético quanto científico. A negligência no tratamento desses animais pode violar um dos princípios fundamentais do método científico - o controle das variáveis - e comprometer a integridade e reprodutibilidade dos resultados experimentais.

A nutrição desempenha um papel crucial no desempenho zootécnico, saúde e bem-estar dos roedores de laboratório. No entanto, a última referência publicada sobre as exigências nutricionais desses animais não considera as diferenças entre as espécies, linhagens e padrões sanitários. Além disso, há pouca compreensão do potencial impacto dos métodos de esterilização da dieta na fisiologia do animal (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1995).

A esterilização da dieta dos roedores de laboratório é uma etapa importante para garantir a ausência de microrganismos que poderiam impactar a saúde dos animais e os resultados dos experimentos (BAKER, 1998). A esterilização por autoclave, utilizando vapor de alta pressão, representa um método eficiente comumente utilizado em muitas instituições de pesquisa devido à sua acessibilidade e baixo custo. Entretanto, a autoclavagem pode provocar modificações físicas e químicas na dieta, incluindo o aumento da dureza dos pellets (BARSZCZ et al., 2014) e perdas nutricionais, como redução da concentração de micronutrientes e menor biodisponibilidade de aminoácidos essenciais (FORD, 1976; MOURA et al., 2020; ZIMMERMAN; WOSTMANN, 1963). Essas modificações físicas e químicas podem variar de acordo com o método de temperatura e tempo empregado (TUŚNIO et al., 2014).

Devido ao impacto da esterilização por autoclave na qualidade nutricional da dieta, foram conduzidas pesquisas para avaliar o efeito do consumo de ração autoclavada no desempenho zootécnico de roedores de laboratório (BARSZCZ et al., 2014; FORD, 1977; KURTZ et al., 2018). Observou-se que o consumo de ração autoclavada tem pouca influência na produção e no crescimento de determinadas linhagens de ratos e camundongos de laboratório, sugerindo que as alterações nutricionais são insuficientes para afetar esses aspectos (BARSZCZ et al., 2014; FORD, 1977; KURTZ et al., 2018).

Embora as evidências indiquem que o consumo de ração esterilizada por autoclave não afeta o desempenho zootécnico das linhagens de ratos e camundongos anteriormente avaliadas, ainda não se sabe se esse método de esterilização tem impacto em linhagens específicas, como camundongos BALB/c nude - animais imunodeficientes amplamente utilizados em estudos de câncer (FLANAGAN, 1966; NEHLS et al., 1994). Além disso, há lacunas no entendimento do mecanismo pelo qual os roedores avaliados não reduzem o desempenho zootécnico mesmo ao consumir ração com menor valor nutricional. Uma hipótese é que os roedores possam passar por adaptações intestinais que ampliam a área de absorção de nutrientes, compensando a perda nutricional decorrente do método de esterilização. Nesse contexto, a análise histomorfométrica é uma ferramenta importante para a avaliação, uma vez que a altura das vilosidades está correlacionada com a área de absorção intestinal e a profundidade das criptas está relacionada com a taxa de renovação intestinal (QI et al., 2020; YAMAUCHI, 2007).

O método de esterilização por autoclave está associado ao aumento de acrilamida (TUŚNIO et al., 2014; TWADDLE et al., 2004), uma substância química com reconhecida toxicidade (EXON, 2006) e com efeitos carcinogênicos (KLAUNIG, 2008). A acrilamida é uma substância hidrofílica que pode se originar em alimentos fontes de proteínas e carboidratos submetidos a altas temperaturas, onde ocorre uma série de reações químicas, como a condensação do grupo amino de um aminoácido com o grupo carbonila de um monossacarídeo. A acrilamida é absorvida através do trato gastrointestinal e difunde-se passivamente por todo o organismo. A principal via metabólica segue pela biotransformação e catalisação da acrilamida pela glutatona S-transferase no fígado (ZHAO; ZHANG; DENG, 2022)

Devido à autoclavagem resultar na produção de compostos tóxicos, como a acrilamida (KURTZ et al., 2018; TUŚNIO et al., 2014; TWADDLE et al., 2004), acredita-se que o consumo da ração esterilizada pode influenciar na resposta imunológica dos roedores de laboratório. Foi observado que a ração autoclavada aumenta a massa do timo em ratos (BARSZCZ et al., 2014) e altera a porcentagem de células imunológicas no sangue e no baço de camundongos (MOROZOVA et al., 2022). Entretanto, ainda há pouco conhecimento sobre os efeitos da autoclavagem da dieta em outros parâmetros imunológicos, sendo importante pesquisas adicionais para avaliar os potenciais efeitos tóxicos que os compostos produzidos pela autoclavagem podem causar no organismo dos roedores de laboratório.

Para abordar essas lacunas, este trabalho buscou avaliar o desempenho de crescimento, o consumo de ração, a conversão alimentar, a atividade imunológica de macrófagos peritoneais e a histomorfometria das vilosidades e criptas intestinais de camundongos Swiss e BALB/c Nude.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. ANIMAIS DE LABORATÓRIO

O uso de animais de laboratório em pesquisas científicas para adquirir conhecimento sobre problemas de saúde, desenvolver e testar novos tratamentos, e estudar o funcionamento dos corpos animais e humanos tem uma longa história. Inicialmente, esses animais eram capturados na natureza ou adquiridos em criadores. No entanto, ao longo do tempo, passaram a ser criados nos próprios laboratórios para estudar sua biologia e comportamento (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2006).

Os biotérios foram desenvolvidos para facilitar o alojamento, manutenção e transporte dos animais necessários aos estudos em andamento. Com a necessidade de aumentar a quantidade e diversificar as espécies, ocorreu a separação dos biotérios de criação dos laboratórios de experimentação. À medida que o conhecimento sobre diferentes espécies cresceu, algumas começaram a ser mais utilizadas do que outras. Os roedores gradualmente ganharam destaques, tornando-se os animais mais utilizados devido ao seu tamanho reduzido, ciclo reprodutivo curto, prole numerosa, fácil manuseio e adaptação ao cativeiro (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2006).

Os roedores de laboratório, como camundongos e ratos, compartilham notáveis similaridades fisiológicas com os humanos, tornando-se modelos importantes para estudar processos fisiológicos e patológicos. A manipulação genética dessas linhagens permite a criação de modelos transgênicos para investigar genes específicos e suas funções. Além disso, comportamentos sociais complexos, baixo custo de manutenção e reprodução rápida e uniformidade genética em algumas linhagens contribuem para sua utilidade em pesquisas em larga escala.

2.2. ROEDORES DE LABORATÓRIO

O uso de ratos e camundongos na pesquisa biomédica remonta ao século XVI, e ao longo do século XX, a ciência de animais de laboratório progrediu, resultando nos primeiros modelos padronizados de roedores utilizados na experimentação (figura 1) (KING H, 1915). Nas últimas décadas, foram criadas numerosas linhagens de animais consanguíneos e híbridos capazes de reduzir as variáveis causadas por diferenças genéticas.



Figura 1 – O Instituto Wistar, fundado como museu de ensino de anatomia em 1892, desenvolveu o rato Wistar, um dos primeiros modelos padronizados de roedores. Fonte: The Wistar Institute.

Os roedores de laboratório podem ser classificados quanto à sua genética, sendo não-consanguíneos ou heterogênicos, e consanguíneos ou isogênicos. Os animais heterogênicos apresentam alta heterozigose em sua constituição genética, permitindo grande diversidade genética na mesma colônia, reproduzindo populações naturais. Em contraste, os animais isogênicos apresentam um alto índice de homozigose, sendo 99% homozigotos após 20 gerações consecutivas do acasalamento entre irmãos ou pais e filhos. Além disso, ao grupo de animais isogênicos podem ser adicionadas características híbridas, defeitos congênitos, mutações ou alterações genéticas (transgênicos) (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2006).

Outra importante classificação diz respeito ao status sanitário dos roedores, considerando o ambiente específico que são mantidos. A microbiota associada a esses animais inclui vírus, bactérias, fungos e parasitas. Roedores gnotobióticos possuem uma microbiota conhecida e são criados em ambientes com barreiras sanitárias absolutas, enquanto roedores livres de germes são isentos de microbiota (BASIC; BLEICH, 2019). Os roedores livres de germes específicos são livres de microrganismos patogênicos específicos, e os animais microbiota definida são intencionalmente contaminados com microrganismos específicos. Por fim, roedores convencionais possuem microbiota indefinida devido à falta de barreiras sanitárias rigorosas, sendo a escolha mais comum devido à sua utilidade, baixo custo de reprodução e manutenção (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2006).

Os roedores mais utilizados como modelos experimentais são os dos gêneros *Rattus* (ratos), *Mus* (camundongos) e *Mesocricetus* (hamster) conforme ilustrado na Figura 2.



Figura 2 - Espécies de roedores mais utilizados na pesquisa científica. A = Rato; B = Camundongo; C = Hamster. Figura criada com BioRender.com.

A tabela 1 resume as principais variáveis biológicas e zootécnicas desses roedores, proporcionando uma compreensão abrangente da biologia e eficiência reprodutiva (National Research Council, 2011).

Tabela 1 - Dados biológicos e zootécnicos de roedores de laboratório.

Variável	Camundongo	Rato Wistar	Hamster
Maturidade sexual	50-60 dias	50-60 dias	42-48 dias
Número de tetas	10	12	14
Tempo de gestação	19-21 dias	19-22 dias	16-18 dias
Tamanho da ninhada	3-14	8-16	8-16
Peso ao nascimento	1-2 g	5-7 g	3-5 g
Idade ao desmame	19-30 dias	21 dias	16-21 dias
Peso ao desmame	8-15 g	35-45 g	25-30 g
Peso adulto (macho)	25-40 g	350-500 g	85-120 g
Peso adulto (fêmea)	20-35 g	250-400 g	75-100 g
Consumo de ração (dia)	4-5 g	10-20 g	10-15 g

2.3. ASPECTOS NUTRICIONAIS DE ROEDORES DE LABORATÓRIO

O cuidado com os roedores de laboratório é essencial, tanto do ponto de vista ético quanto científico. A negligência no tratamento desses animais pode comprometer a integridade e reprodução dos resultados experimentais, uma vez que fatores externos têm o potencial de impactar significativamente seus sistemas biológicos. Os roedores, como mamíferos homeotérmicos, passam por adaptações metabólicas para compensar as variações no meio ambiente externo, o que pode influenciar a fisiologia dos animais e, conseqüentemente, os resultados experimentais (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2006).

Dentre os fatores externos que podem afetar a fisiologia animal, a nutrição possui um impacto significativo. A ingestão de nutrientes abaixo ou acima do requerido pode influenciar na resposta animal. O estado nutricional do animal de laboratório influencia sua capacidade de alcançar seu potencial genético de crescimento, reprodução e longevidade, além de responder a infecções e outros estresses ambientais. Uma dieta nutricionalmente equilibrada é importante tanto para o bem-estar dos animais de laboratório quanto para garantir a validade e replicabilidade dos resultados experimentais, evitando vieses nutricionais não intencionais. Portanto, a dieta deve ser equilibrada, padronizada e livre de contaminantes para assegurar resultados experimentais fidedignos e replicáveis (National Research Council, 1995).

As necessidades nutricionais dos roedores podem ser afetadas pelas diferenças genéticas entre espécies e linhagens, assim como pelas fases do ciclo de vida, especialmente em resposta ao crescimento, gravidez ou lactação. Alterações ambientais, como variações de temperatura, ciclo de luz e outros fatores, também podem interferir nas exigências nutricionais. Por exemplo, a exposição a temperaturas amenas aumenta as necessidades energéticas, uma vez que os animais são obrigados a gastar energia para manter uma temperatura corporal constante. Altas temperaturas, estímulos perturbadores, conflitos sociais ou outros fatores ambientais reduzem a ingestão de alimentos. Por exemplo, o estresse produzido pelos procedimentos experimentais como cirurgias ou substâncias de teste podem alterar a ingestão alimentar (National Research Council, 1995).

Os animais abrigam populações de microrganismos no trato digestivo que desempenham um papel fundamental na síntese de nutrientes, incluindo vitaminas, aminoácidos e ácidos graxos de cadeia curta. No rato e no camundongo, a maior parte da atividade microbiana está no cólon, e muitos dos nutrientes produzidos não estão disponíveis para o hospedeiro a menos que as fezes sejam consumidas, como é comum para roedores dietéticos (National Research Council, 1995). A contribuição desses nutrientes para a nutrição do hospedeiro varia de acordo com a composição da dieta, as condições de criação e a espécie. Portanto, a compreensão da microbiota intestinal torna-se crucial, especialmente em animais livres de germes ou específicos em patógenos, onde a perda total ou parcial da microbiota pode influenciar as necessidades dietéticas.

2.4. DIETAS PARA ROEDORES DE LABORATÓRIO

No início do século XX, quando os roedores padronizados foram introduzidos como modelos na pesquisa científica, as necessidades nutricionais desses animais eram desconhecidas. As dietas eram inicialmente baseadas em grãos e suplementos para um crescimento adequado. No entanto, na década de 1940, foram introduzidas as primeiras dietas purificadas, consistindo em macronutrientes refinados e micronutrientes puros (BLACK; MCKIBBIN; ELVEHJEM, 1941). Entretanto, essas formulações eram nutricionalmente inadequadas, imprecisas e não padronizadas, resultando em baixa reprodutibilidade e imprecisões em determinadas pesquisas (GREENFIELD; BRIGGS, 1971).

O avanço significativo na compreensão das necessidades de formulações nutricionalmente adequadas para padronizar a alimentação dos roedores ocorreu em 1973, quando o *Institute of Nutrition* (AIN) formou um comitê que desenvolveu a primeira dieta de código aberto amplamente aceita para ratos e camundongos, conhecida como AIN-76 (BIERI J, 1977). Posteriormente, essa dieta foi aprimorada para aumentar a vitamina K e substituir parcialmente a sacarose por glicose ou amido, sendo renomeada como AIN-76A. A AIN-76A se tornou padrão ouro para ratos e camundongos de laboratório, contribuindo significativamente para a padronização dos experimentos (BIERI, 1980).

No entanto, a evolução do conhecimento nutricionalmente levantou questionamentos sobre a formulação AIN-76A (REEVES, 1989). O uso de dieta com alto teor de sacarose em estudos de longo prazo associado a problemas como hiperlipidemia, esteatose hepática e intolerância à glicose, além de resultar em calcificação renal, especialmente em ratas (REEVES, 1989). Em busca de melhorias, foi desenvolvida a AIN-93 (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993).

A AIN-93 foi publicada com formulações específicas para crescimento, gravidez e lactação (AIN-93G) e manutenção (AIN-93M) de roedores adultos conforme apresentado na tabela 2 (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993). A dieta de manutenção foi desenvolvida com base em sugestões de pesquisadores que indicavam que uma alimentação com um menor teor de proteína e gordura seria mais adequada para estudos a longo prazo (CREES, 1989). Outras alterações na formulação incluíram misturas de vitaminas e minerais, redução do teor de sacarose, substituição do óleo

de milho pelo óleo de soja e substituição do aminoácido L-metionina por L-cistina (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993).

Tabela 2 – Resumo da composição nutricional das formulações AIN-93G e AIN-93M.

Nutrientes	Formulação de dieta ¹	
	AIN-93G	AIN-93M
Energia total (Kcal)	220	22
Carboidrato total (g)	643,7	727,3
Proteína total (g)	178,6	125,8
Gordura total (g)	70	40
Vitaminas		
Ácido nicotínico (mg)	10	10-14
Pantoténico (mg)	15	15
Piridoxina (mg)	6	6
Riboflavina (mg)	6	6
Ácido fólico (mg)	2	2
Vitamina A (UI)	4000	4000
Vitamina D (UI)	1000	1000
Vitamina E (UI)	75	75
Vitamina K (µg)	900	860
Minerais		
Cálcio (mg)	5000	5000
Fósforo (mg)	3000	3000
Potássio (mg)	1631	1631
Sódio (mg)	1039	1033
Ferro (mg)	45	45
Zinco (mg)	38	35

¹Valores baseados em estimativas da composição nutricional dos ingredientes na formulação não peletizada.

Embora a AIN-93 permaneça uma referência para padronização da nutrição dos roedores de laboratório, já se passaram quase três décadas desde a formulação inicial. A crescente sensibilidade dos resultados experimentais a fatores externos e o

avanço do conhecimento sobre a influência nutricional na fisiologia animal destacam a necessidade de revisão e aprimoramento contínuo dessa formulação (KLURFELD; GREGORY; FIOROTTO, 2021).

A ração comercializada possui formulação nutricional baseada na AIN-93, mas as matérias-primas podem variar para atender às exigências nutricionais com o mínimo custo possível (CAVALCANTI; BEHNKE, 2005). O milho e o farelo de soja são as principais matérias-primas das rações, ocupando mais de 70% das formulações para roedores de laboratório. Devido a ajustes operacionais, essas matérias primas podem ser substituídas eventualmente pelo sorgo, farelo de trigo, quirera de arroz, farelo de glúten de milho, girassol, derivados lácteos, entre outros (CAVALCANTI; BEHNKE, 2005). Essa busca por formulações de mínimo custo pode resultar em lotes heterogêneos de ração ao longo do ano, o que pode prejudicar no desenvolvimento dos animais.

A ração peletizada é o tipo mais utilizado para roedores de laboratório. A uniformidade na sua composição desempenha papel importante nas pesquisas, contribuindo para a consistência nas condições experimentais. A homogeneidade dos ingredientes em cada pellet assegura que os roedores recebam uma dieta equilibrada e padronizada, minimizando variações nutricionais que poderiam afetar os resultados experimentais. Além disso, a textura compacta dos pellets facilita a ingestão controlada e promove o desgaste dental adequado nos roedores, prevenindo complicações dentárias que poderiam influenciar negativamente nos experimentos (CAVALCANTI; BEHNKE, 2005).

2.5. MÉTODOS DE ESTERILIZAÇÃO DA DIETA

A nutrição desempenha um papel crucial no desempenho zootécnico, saúde e bem-estar dos roedores de laboratório. No entanto, a última diretriz publicada sobre as exigências nutricionais desses animais não considera o potencial impacto do método de esterilização da dieta na fisiologia dos animais (National Research Council, 1995).

A esterilização da dieta dos roedores de laboratório desempenha uma etapa importante para garantir a ausência de microrganismos que poderiam afetar a saúde dos animais e os resultados dos experimentos (BAKER, 1998). Os métodos de esterilização incluem autoclavagem, irradiação e radiação gama. A autoclavagem

utiliza calor e pressão para esterilizar a ração, enquanto a irradiação abrange vários métodos de radiação ionizante, e a radiação gama é um tipo específico que utiliza raios gama para alcançar esterilidade. Esses métodos são essenciais para garantir que os alimentos destinados aos roedores estejam livres de microrganismos nocivos, especialmente quando usados para camundongos livres de germes ou em ambientes de pesquisa onde contaminantes pode afetar os resultados dos experimentos.

A escolha do método pode depender da capacidade ou do orçamento da instituição. Em comparação com os outros métodos, a autoclavagem é considerada um método igualmente eficaz, porém mais acessível e econômica para esterilizar a ração de roedores em instituições de pesquisa.

Apesar do seu baixo custo, a autoclavagem pode resultar no aumento da dureza dos pellets (BARSZCZ et al., 2014), causar perdas nutricionais, reduzindo a concentração de micronutrientes e a biodisponibilidade de aminoácidos essenciais (FORD, 1976; MOURA et al., 2020; ZIMMERMAN; WOSTMANN, 1963), e aumentar a concentração de produtos tóxicos como a acrilamida. (TUŚNIO et al., 2014; TWADDLE et al., 2004). A acrilamida é um dos produtos oriundos da reação química entre açúcares e aminoácidos presentes no alimento, neste caso a ração, submetidos a altas temperaturas. Esta reação é caracterizada por um escurecimento do alimento alterando a cor e sabor deste e sendo conhecida como reação de Maillard (ALJAHDALI; CARBONERO, 2019). Portanto, é importante que pesquisadores e instituições considerem os potenciais efeitos prejudiciais e tóxicos que a autoclavagem pode ocasionar em dietas de roedores de laboratório e examinem o potencial impacto do processo de autoclavagem em variáveis importantes relacionadas à saúde e ao bem-estar dos roedores de laboratório.

2.6. SISTEMA IMUNOLÓGICO DOS ROEDORES

Os roedores de laboratório apresentam um sistema imunológico complexo que compartilha semelhanças fundamentais com o sistema imunológico humano. A maior parte de nossa compreensão do sistema imunológico de mamíferos vem de estudos detalhados de linhagens de camundongos de laboratório do camundongo (ABOLINS et al., 2017).

No âmbito do sistema imunológico, os leucócitos desempenham um papel crucial, sendo responsáveis por proteger o organismo contra invasores como

bactérias, vírus e células anormais. Diferentes tipos de leucócitos, como neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos, trabalham em conjunto na defesa do organismo contra agentes patogênicos (VINEY; RILEY, 2017).

Os leucócitos podem ser categorizados em dois grupos principais: granulócitos e agranulócitos. Os granulócitos incluem neutrófilos, eosinófilos e basófilos, enquanto os agranulócitos consistem em linfócitos e monócitos. Os monócitos, por sua vez, desempenham um papel fundamental no sistema imunológico, dando origem aos macrófagos (VINEY; RILEY, 2017).

Os macrófagos, como células fagocitárias, têm a notável capacidade de englobar e digerir partículas estranhas, como microrganismos e detritos celulares, desempenhando um papel central na imunidade inata (HIRAYAMA; IIDA; NAKASE, 2017). Além de sua ação fagocitária, os macrófagos apresentam antígenos para células T do sistema imunológico, desencadeando respostas imunes específicas. Essas células também são cruciais na regulação da inflamação, promovendo a cicatrização de tecidos e modulando a resposta imunológica (KIERDORF et al., 2015). A importância dos macrófagos na imunidade é destacada por seu papel em diversas condições patológicas, incluindo o descarte de células nocivas por fagocitose, a apresentação de antígenos às células T e a produção de citocinas inflamatórias como a interleucina (IL)-6 ou o fator de necrose tumoral (TNF)- α (3).

O conhecimento das características imunológicas contribui para a validade dos estudos que utilizam roedores de laboratório como modelos em pesquisas imunológicas e biomédicas. Entretanto, características ambientais, abióticas e bióticas, provavelmente moldam a composição celular e a função do sistema imunológico desses animais (GRAHAM, 2021). O potencial impacto do método de esterilização da dieta na fisiologia dos animais é desconhecido, e devido à autoclavagem resultar na produção de compostos tóxicos, como a acrilamida (KURTZ et al., 2018; TUŚNIO et al., 2014; TWADDLE et al., 2004) e possivelmente influenciar a microbiota intestinal (YUAN; HE, 2017), acredita-se que a esterilização possa ter um impacto na resposta imunológica dos roedores de laboratório. Portanto, investigações devem ser consideradas para melhor compreensão e garantia da acurácia e reprodutibilidade dos estudos que envolvem os roedores de laboratório.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Examinar o impacto do processo de autoclavagem em rações peletizadas no desempenho de crescimento, consumo e conversão alimentar, atividade de macrófagos peritoneais, e histomorfometria intestinal de camundongos Swiss e BALB/c Nude.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Mensurar o ganho de peso dos animais ao longo de quatro semanas após o desmame;
2. Avaliar o consumo e conversão alimentar durante o período experimental de quatro semanas;
3. Coletar macrófagos peritoneais para estimar a produção de óxido nítrico;
4. Realizar análise histomorfométrica das vilosidades e criptas intestinais;
5. Determinar se a autoclavagem altera de forma estatisticamente significativa as variáveis acima.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ASPECTOS ÉTICOS

Todas as práticas experimentais foram conduzidas em conformidade com os princípios éticos estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (protocolo nº 586).

4.2. MODELOS ANIMAIS

Para examinar o impacto da ração autoclavada em aspectos zootécnico, imunológicos e intestinais, foram utilizados camundongos Swiss, reconhecidos por sua variabilidade genética, e camundongos BALB/c Nude, caracterizados por sua condição de imunodeficiência, devido à ausência do timo (figura 3).

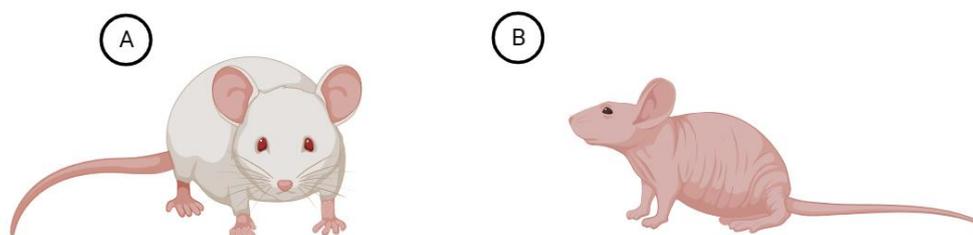


Figura 3 – Modelos animais utilizados. A = Camundongo Swiss; B = Camundongo BALB/c Nude.

4.3. AMBIENTE EXPERIMENTAL

Todas as etapas experimentais (figura 4) foram conduzidos na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). A criação dos animais e o experimento de crescimento foram realizados no Biotério central com ambiente experimental mantido sob condições controladas, com temperatura de $21 \pm 2^\circ\text{C}$ e ciclo claro-escuro de 12 horas, iniciando o período claro às 06:00 horas e o período escuro às 18:00 horas. O ensaio de Griess foi realizado no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (LBCT) e todas as etapas para análise da histomorfometria intestinal foram feitas no Laboratório de Morfologia e Patologia Animal (LMPA).

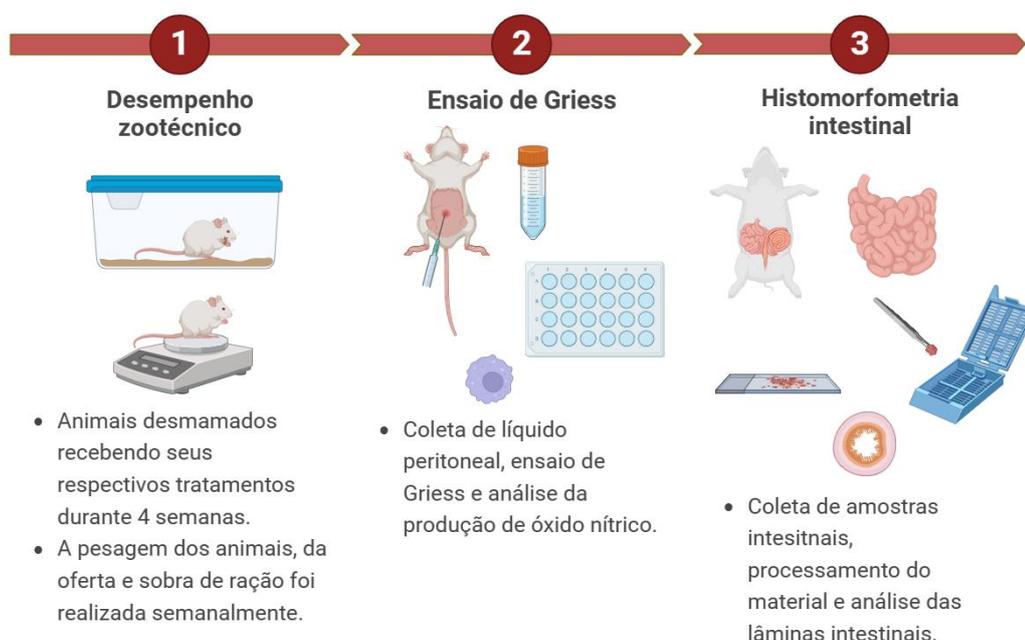


Figura 4 – Ordem cronológica das etapas experimentais. Figura criada com BioRender.com.

4.4. INSTALAÇÕES DO BIOTÉRIO

Os animais foram individualmente alojados em mini isoladores, contendo cama de maravalha laminada de *Pinus elliottii*, em rack ventilado Alesco. Todos os materiais, incluindo gaiolas, maravalha, comedouros e bebedouros, foram esterilizados em autoclave RED HS-580/2011.

4.5. TRATAMENTO

Como tratamento, utilizou-se ração peletizada comercializada destinada a roedores de laboratório, marca NUVILAB – QUIMTIA, formulada de acordo com a composição nutricional apresentada na tabela 3.

Tabela 3 - Composição nutricional da ração comercial para roedores de laboratório.

Quantidade de garantia por quilograma de produto		%
Proteína bruta	220 g	22
Umidade	125 g	12,5
Extrato etéreo	40 g	4
Matéria mineral	90 g	9
Fibra bruta	70 g	7
Cálcio	10-14 g	10-14
Fósforo	8 g	8

Ingredientes: farelo de soja, farelo de trigo, grão de milho, óleo de soja refinado, calcário calcítico, calcário dolomítico, cloreto de sódio, fosfato monobicálcico, L-metionina, L-lisina, biotina, cloreto de colina, niacina, pantotenato de cálcio, vitamina A, vitamina B1, vitamina B12, vitamina B6, vitamina D3, vitamina E, vitamina K3, ácido fólico, iodato de cálcio, selenito de sódio, sulfato de cobalto heptahidratado, sulfato de cobre pentahidratado, sulfato de ferro, sulfato de manganês, sulfato de zinco, Butihidroxitolueno.

A ração foi oferecida aos camundongos na forma esterilizada e não esterilizada. A esterilização foi realizada em autoclave RED HS-580/2011 a 121°C por 20 minutos

(figura 5), seguindo o método padrão de tempo e temperatura para minimizar efeitos prejudiciais ao valor nutricional da ração (TUSNIO et al. 2014).

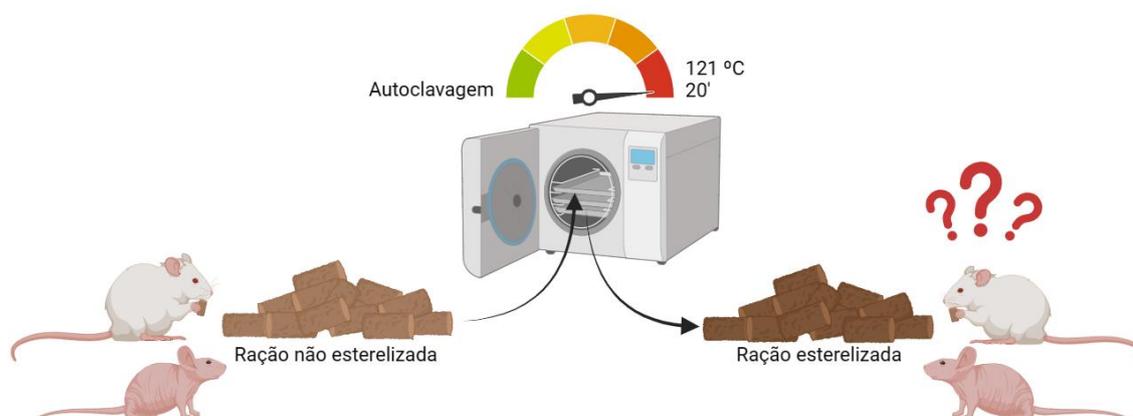


Figura 5 – Método de esterilização da ração. Figura criada com BioRender.com.

4.6. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O experimento seguiu o delineamento inteiramente casualizado (DIC). Em cada grupo experimental, foram alocados 10 animais, sendo cinco machos e cinco fêmeas de cada modelo de roedor, desmamados entre três e quatro semanas de idade. Todos os roedores foram pesados individualmente em uma balança GEHAKA modelo BG8000 e distribuídos aos grupos correspondentes por estratificação do peso corporal (tabela 4), considerando que o peso inicial poderia influenciar o consumo alimentar e o ganho de peso ao longo do experimento.

Tabela 4 - Peso médio dos animais e respectivos grupos.

Camundongos	Tratamentos	Sexo	Peso corporal (g)
Swiss	RA	M	14,78 ± 2,72
	RNA	M	13,82 ± 1,52
	RA	F	14,02 ± 0,98
	RNA	F	13,38 ± 0,92
BALB/c Nude	RA	M	9,35 ± 1,91
	RNA	M	10,4 ± 1,73
	RA	F	9,72 ± 1,90

RNA	F	10,05 ± 2,55
-----	---	--------------

RA = ração autoclavada; RNA = ração não autoclavada; M = macho; F = Fêmea.

4.7. DESEMPENHO DE CRESCIMENTO

O desempenho de crescimento dos camundongos teve duração de quatro semanas e buscou avaliar o consumo de ração, o ganho de peso corporal em relação ao peso inicial e a conversão alimentar. Após a pesagem inicial, os animais foram alojados individualmente e receberam 100 ± 5 g de ração. O peso corporal e as sobras de ração foram registrados semanalmente, junto a troca de gaiolas e a oferta de nova ração, a fim de reduzir os efeitos do estresse.

4.8. AVALIAÇÃO DA CONVERSÃO ALIMENTAR

A conversão alimentar foi avaliada utilizando a seguinte fórmula: conversão alimentar = consumo total de ração / ganho total de peso (BARTH; MCCONNELL, 1969).

4.9. COLETA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS

Os camundongos foram sacrificados por inalação de dióxido de carbono em uma câmara especial para eutanásia. A região abdominal dos animais foi mergulhada em álcool 70% antes da incisão ao longo da linha média com tesoura estéril. Foi inserida uma agulha na parede peritoneal e injetado 8 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) em cada animal. Em seguida, o líquido peritoneal foi aspirado e alocado em tubos falcon de 15 mL sobre gelo para preservar as células do lavado peritoneal.

4.10. ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

A avaliação do óxido nítrico (NO) produzido pelos macrófagos peritoneais foi realizada indiretamente pela quantificação de nitrito, utilizando o ensaio de Griess (BRATTON; MARSHALL, 1939; GRIESS, 1879). Os macrófagos do líquido peritoneal foram adicionados ao *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, contendo 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e ativadores como Interferon- γ e Lipopolissacarídeo (LPS).

As células foram cultivadas por 24 e 48 horas para avaliar a quantidade de nitrito em duplicata utilizando o reagente Griess.

Foi elaborada uma curva-padrão com quantidades definidas de nitrito de sódio em DMEM. Em seguida, 50 μ L de sobrenadante do cultivo foram adicionados em placas de 24 poços, em duplicata para cada amostra. Posteriormente, foram adicionados 50 μ L de solução de Griess (uma solução com 1,5 mL de ácido fosfórico e 300 mg de sulfanilamida em 28,5 mL de água deionizada, e outra solução de 30 mg de N-(1-Naftil) etilenodiamina em 30 mL de água deionizada) por poço de amostras e pontos da curva. A placa foi lida em um leitor de microplacas (Molecular Probes Versa Max) a 540 nm de absorbância.

Os resultados foram correlacionados com a curva-padrão, e a quantidade de nitrito detectada no ensaio de Griess é proporcional à quantidade de óxido nítrico produzida pelos macrófagos (DIRSCH; STUPPNER; VOLLMAR, 1998).

4.11. ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA INTESTINAL

Após a coleta dos macrófagos peritoneais, foi removido todo o intestino delgado dos animais para coleta de amostras dos segmentos duodenal, jejunal e ileal. Os segmentos foram lavados com água destilada para remover qualquer quimo alimentar e fixados em formaldeído a 10% durante 72 horas. Após a fixação, os tecidos foram submetidos à técnica padrão de desidratação em concentrações crescentes de álcool e xilol no processador de tecidos Leica ASP300 S. Os tecidos desidratados foram incluídos em parafina, cortados em micrótomo (5 μ m de espessura) e colocados em lâminas de microscópio na banheira histológica. Foi preparada uma lâmina por animal e em cada lâmina colocados três cortes. Para mensuração das vilosidades e criptas intestinais, as lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina. As lâminas foram observadas em Microscópio óptico Leica - DM4 B, e as imagens foram capturadas por uma câmera digital Leica DFC450 C.

A medição das vilosidades e criptas intestinais foram feitas no software LAS utilizando a ferramenta de linha reta, de acordo com a unidade adotada (μ m). As medidas de altura de vilosidades foram tomadas a partir da base superior da cripta até o ápice da vilosidade. A profundidade de criptas foi medida desde sua base até a transição cripta-vilosidade (figura 6). Para cada animal foram medidas de forma

aleatória 10 vilosidades e 10 criptas. A metodologia dessas análises foi baseada no estudo feito por CARUSO; DEMONTE; NEVES (2012).



Figura 6 – Medição (μm) da altura das vilosidades e profundidade das criptas intestinais com a ferramenta de linha reta do Leica Application Suite (LAS). (Ampliação: 100 \times).

4.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram descritos como média e desvio padrão. O teste de Shapiro-Wilk e o teste de Levene foram utilizados para análise de normalidade e homogeneidade dos dados, respectivamente. Após verificar a normalidade e a homogeneidade, foi utilizado o teste T de amostras independentes para analisar se houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Valores de p menores do que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Todas as análises foram realizadas no software Rstudio versão 2023.06.2+561.

5. RESULTADOS

5.1. DESEMPENHO DE CRESCIMENTO

Durante o período experimental de quatro semanas, os camundongos albinos suíços machos e fêmeas exibiram um aumento no peso corporal (figura 7). Entretanto, a diferença no ganho de peso total entre o grupo que consumiu ração autoclavada e não autoclavada não foi estatisticamente significativa para camundongos machos ($p = 0,57$) ou fêmeas ($p = 0,82$).

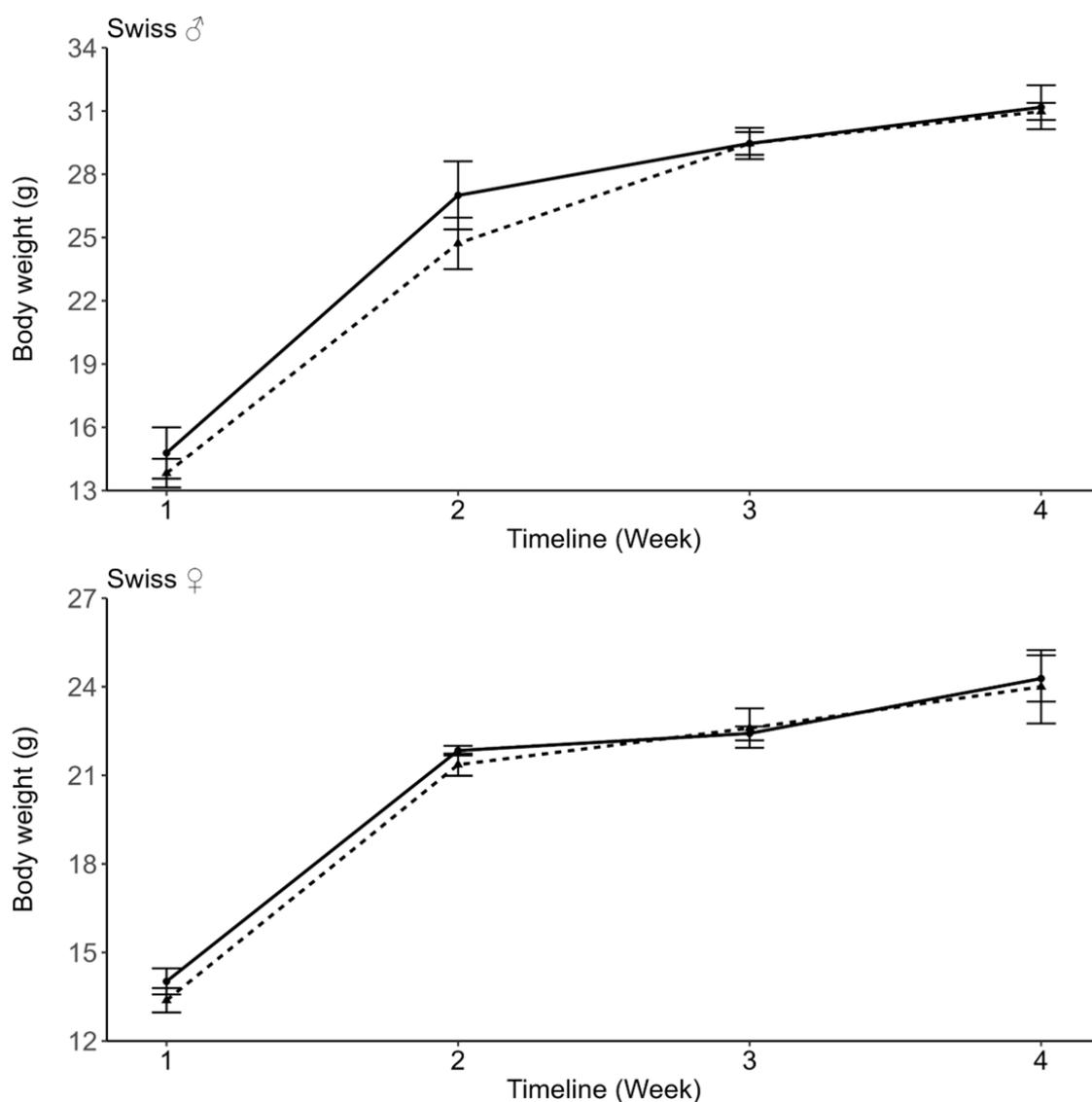


Figura 7 – Ganho de peso corporal de camundongos Swiss durante quatro semanas. Linha normal = Ração autoclavada; Linha tracejada = Ração não autoclavada.

Da mesma forma, não houve diferença significativa no ganho de peso corporal total entre os grupos ração autoclavada e ração não autoclavada para camundongos BALB/c Nude machos ($p = 0,83$) e fêmeas ($p = 0,89$) conforme ilustrado na figura 8.

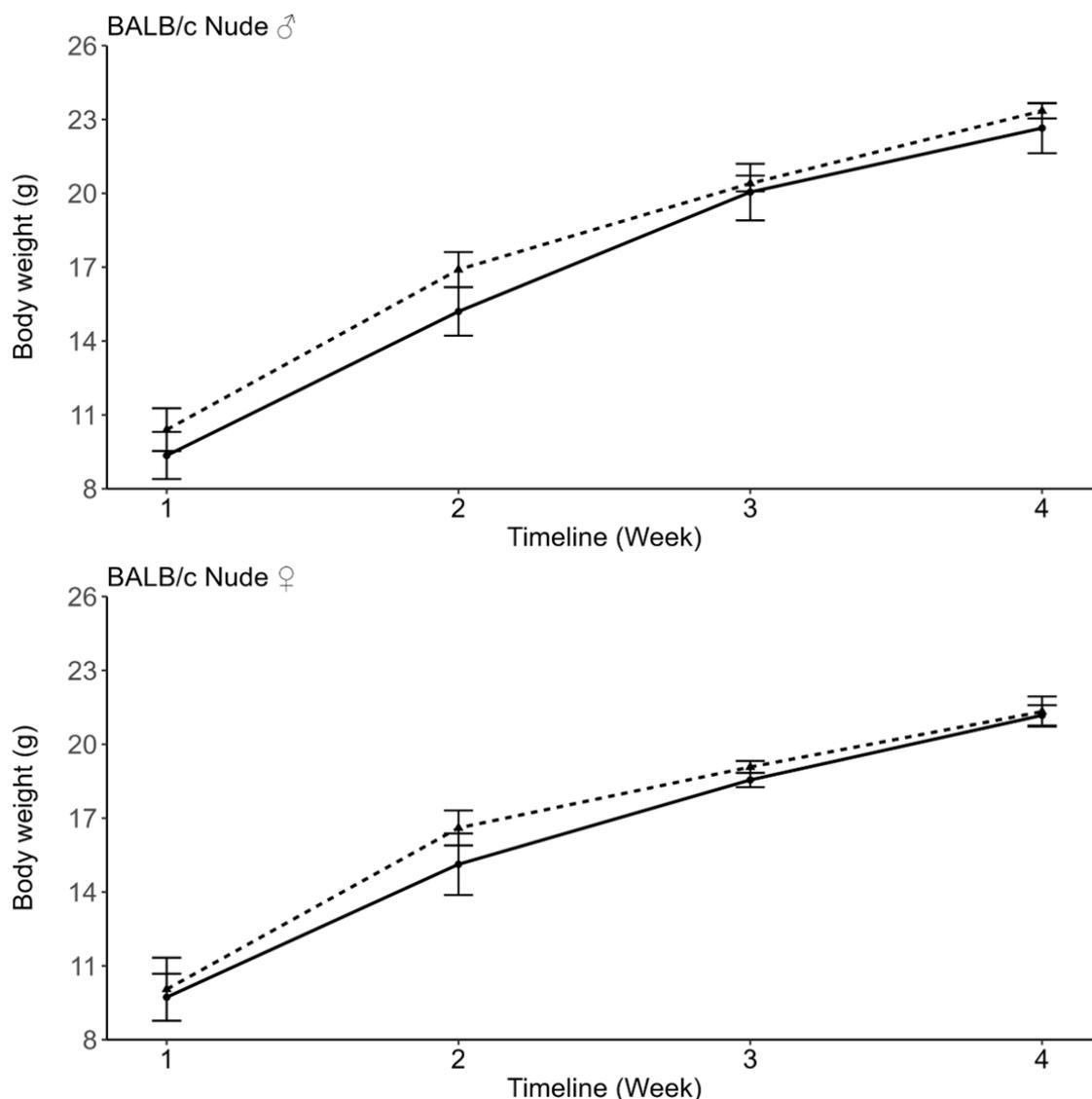


Figura 8 – Ganho de peso corporal de camundongos BALB/c Nude durante quatro semanas. Linha normal = Ração autoclavada; Linha tracejada = Ração não autoclavada.

O consumo total de ração durante o período experimental de quatro semanas não diferiu significativamente entre os grupos de ração autoclavada e não autoclavada para camundongos Swiss machos ($p = 0,95$) e fêmeas ($p = 0,59$) (Tabela 5).

Tabela 5 - Consumo total de ração dos camundongos Swiss durante quatro semanas.

Sexo	Tratamento	Consumo total de ração (g)
M	RA	180,40 ± 6,63
M	RNA	180,16 ± 5,74
F	RA	173,92 ± 14,16
F	RNA	178,16 ± 9,42
Teste-T		
M		p = 0,95
F		p = 0,59

RA = ração autoclavada; RNA = ração não autoclavada; M = macho; F = Fêmea.

Resultados semelhantes foram observados em camundongos BALB/c Nude, onde o consumo total de ração não diferiu significativamente entre os grupos (Tabela 6).

Tabela 6 - Consumo total de ração dos camundongos BALBc/ Nude durante quatro semanas.

Sexo	Tratamento	Consumo total de ração (g)
M	RA	164,05 ± 16,08
M	RNA	173,83 ± 14,62
F	RA	166,92 ± 16,40
F	RNA	177,40 ± 7,97
Teste-T		
M		p = 0,44
F		p = 0,32

RA = ração autoclavada; RNA = ração não autoclavada; M = macho; F = Fêmea.

5.2. CONVERSÃO ALIMENTAR

A avaliação da conversão alimentar nos tratamentos para ração autoclavada e não autoclavada em ambas as linhagens de camundongos não revelou diferença estatística entre os grupos para os camundongos Swiss (tabela 7) ou BALB/c Nude (tabela 8).

Tabela 7 – Conversão alimentar dos camundongos Swiss.

Sexo	Tratamento	Conversão alimentar (g)
M	RA	11,1 ± 1,23
M	RNA	10,6 ± 1,52
F	RA	17,64 ± 3,78
F	RNA	17,39 ± 3,21
Teste-T		
M		P = 0,60
F		P = 0,91

RA = ração autoclavada; RNA = ração não autoclavada; M = macho; F = Fêmea.

Tabela 8 – Conversão alimentar dos camundongos BALB/c Nude.

Sexo	Tratamento	Conversão alimentar (g)
M	RA	12,49 ± 1,91
M	RNA	13,51 ± 1,07
F	RA	14,79 ± 2,51
F	RNA	16,03 ± 2,66
Teste-T		
M		p = 0,41
F		p = 0,56

RA = ração autoclavada; RNA = ração não autoclavada; M = macho; F = Fêmea.

5.3. PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

Macrófagos peritoneais de camundongos Swiss alimentados com ração autoclavada exibiram uma tendência maior de produzir NO dentro de 24 h em comparação com camundongos que consumiram ração não autoclavada (figura 9). Após 48 de cultivo, foi observado um aumento significativo na produção de NO no grupo ração autoclavada em comparação ao grupo ração não autoclavada ($p = 0,03$).

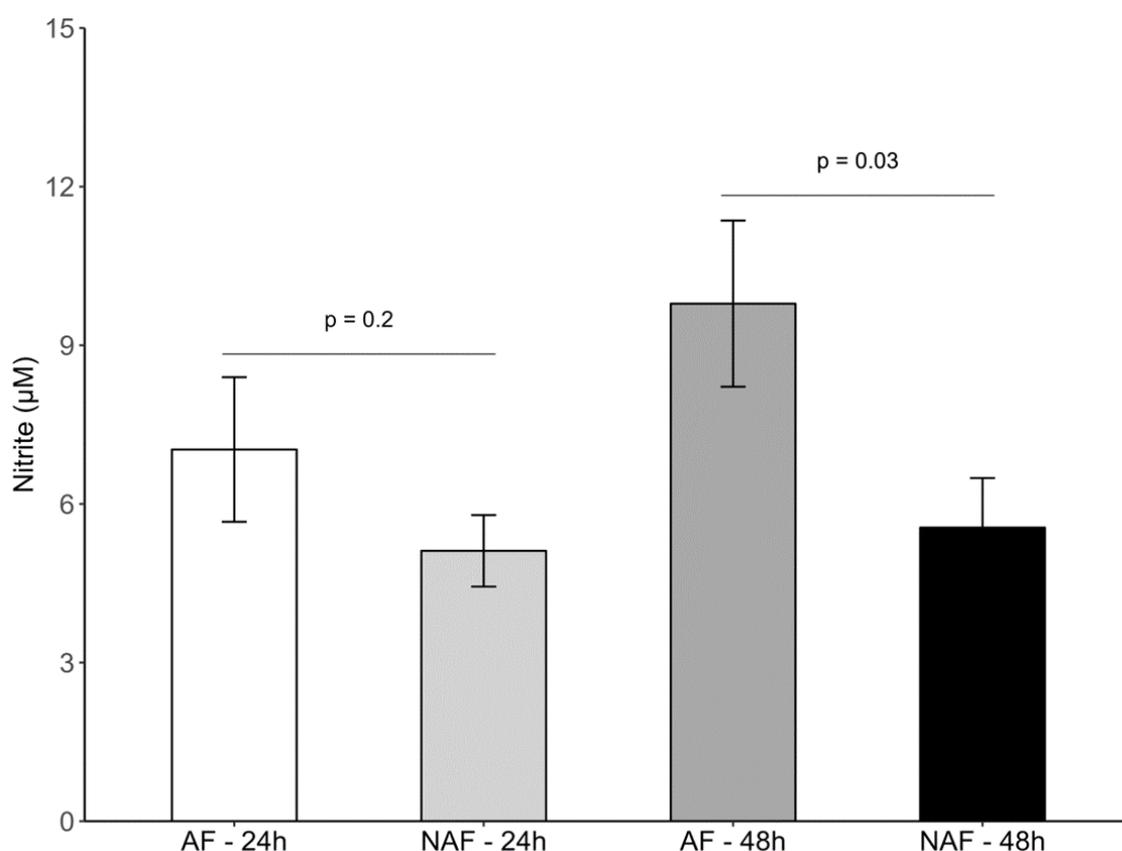


Figura 9 - Produção de NO em macrófagos peritoneais de camundongos Swiss. RA = Ração autoclavada; RNA = Ração não autoclavada.

Da mesma forma, macrófagos peritoneais coletados de camundongos BALB/c Nude mostraram um aumento significativo na produção de NO no grupo ração autoclavada após 48 h de cultivo ($p = 0,045$), conforme representado na figura 10.

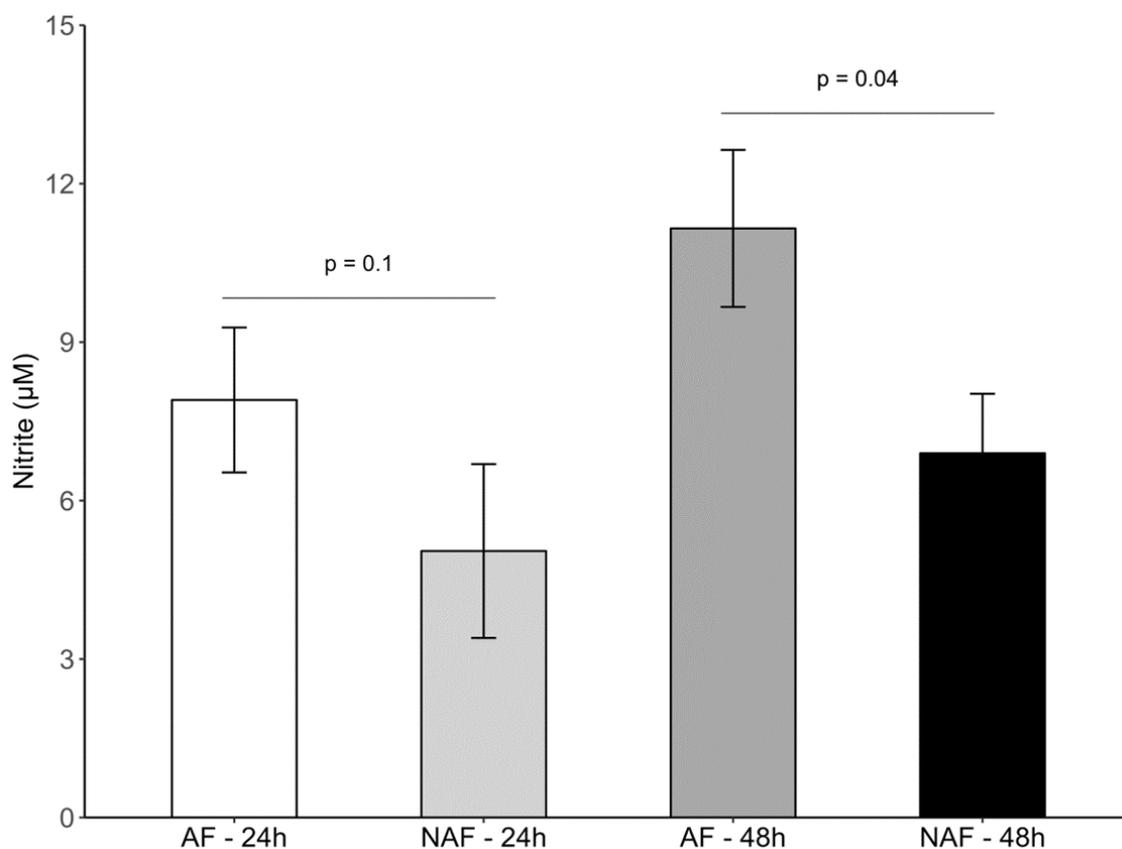


Figura 10 - Produção de NO em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c Nude. RA = Ração autoclavada; RNA = Ração não autoclavada.

5.4. HISTOMORFOMETRIA DAS VILOSIDADES E CRIPTAS INTESTINAIS

A comparação entre os grupos de ração autoclavada e não autoclavada revelou um comprimento significativamente maior das vilosidades nas amostras intestinais de camundongos Swiss alimentados com ração autoclavada em comparação com aqueles alimentados com ração não autoclavada ($p = 0,038$). Além disso, a profundidade das criptas foi significativamente menor no grupo que recebeu ração autoclavada ($p = 0,008$) (figura 11).

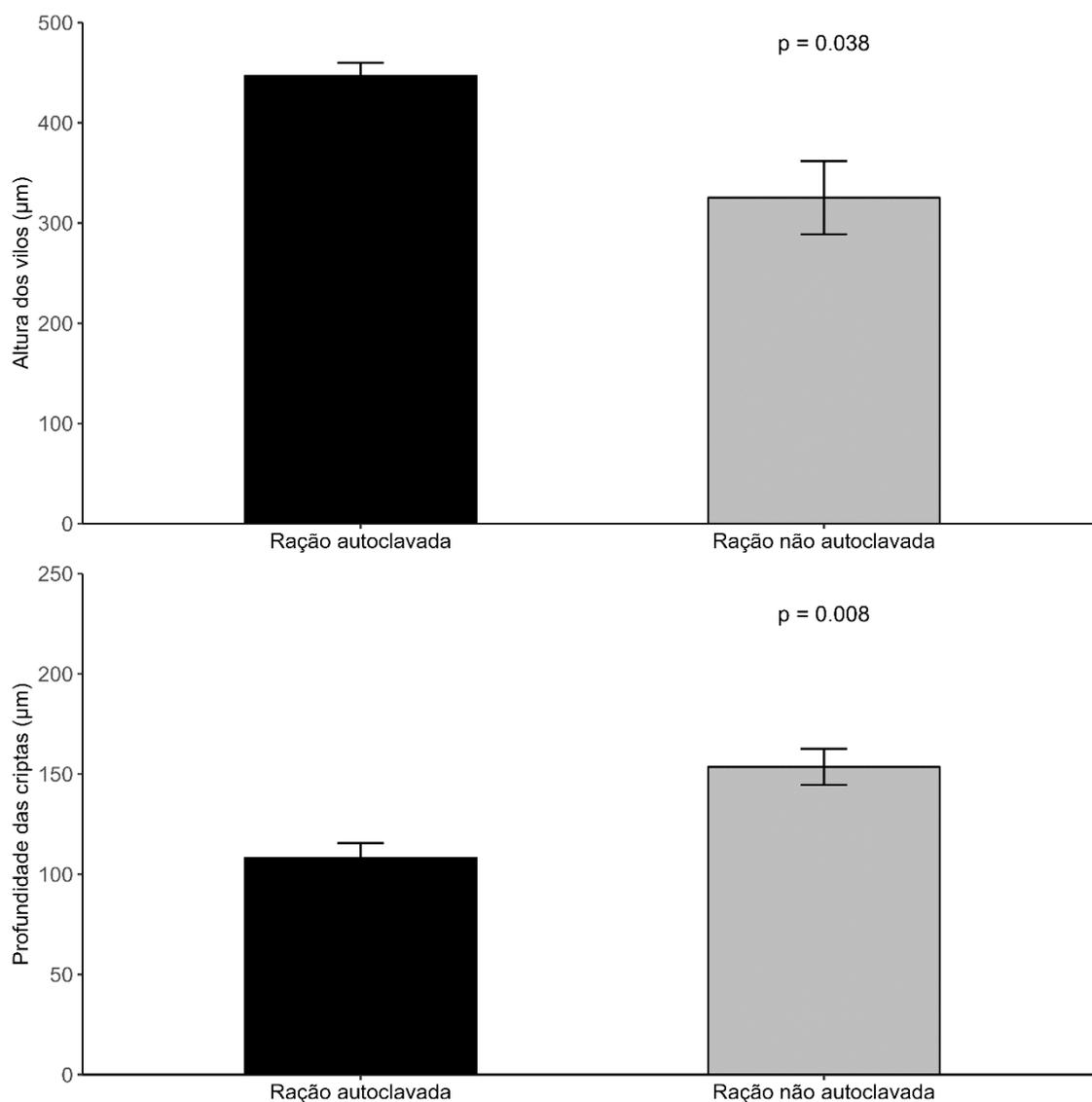


Figura 11 - Mensuração da altura das vilosidades e profundidade de criptas intestinais de camundongos Swiss.

Em relação aos camundongos BALB/c Nude, as amostras intestinais dos animais alimentados com ração autoclavada revelaram uma altura significativamente maior das vilosidades em comparação com o grupo que consumiu ração não autoclavada ($p = 0,05$). Entretanto, a profundidade das criptas não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ($p = 0,17$) (figura 12).

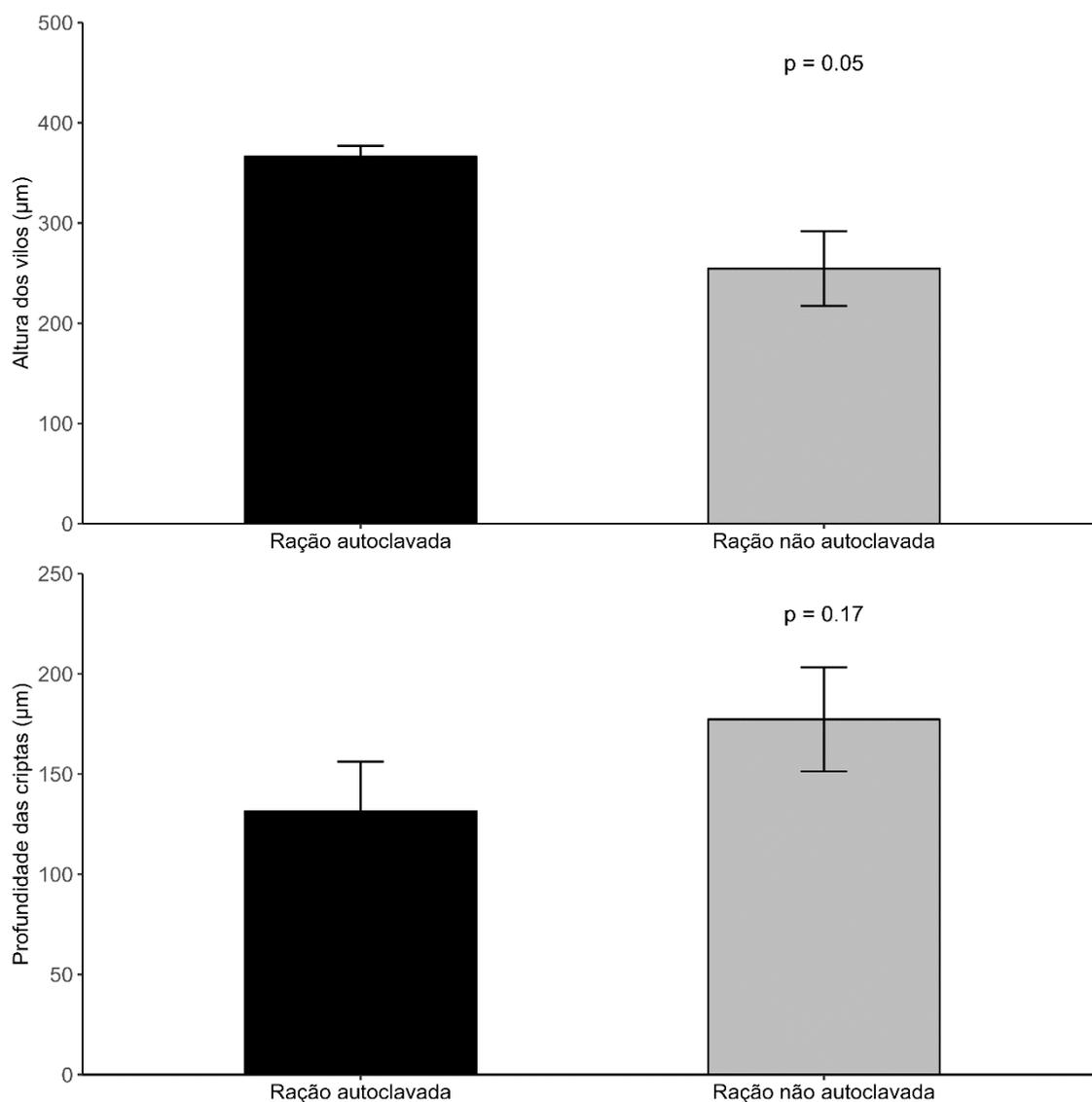


Figura 12 - Mensuração da altura das vilosidades e profundidade de criptas intestinais de camundongos BALB/c Nude.

6. DISCUSSÃO

O conhecimento da influência do consumo de ração autoclavada no desempenho zootécnico de linhagens específicas de roedores de laboratório, como os camundongos BALB/c Nude, apresenta lacunas. Além disso, é curioso o motivo da maioria das linhagens estudadas até o momento não apresentarem redução no desempenho zootécnico, mesmo ao consumir uma ração com menor teor nutricional. Outro ponto relevante, é sobre o potencial impacto da autoclavagem da dieta em parâmetros imunológicos de roedores de laboratório devido à produção de compostos tóxicos como a acrilamida. Para abordar essas questões, avaliamos o impacto da

autoclavagem em rações peletizadas no desempenho de crescimento, consumo e conversão alimentar, atividade de macrófagos peritoneais, e histomorfometria intestinal de camundongos Swiss e camundongos BALB/c Nude.

Durante as quatro semanas do experimento, ambos os sexos de camundongos Swiss e BALB/c Nude apresentaram aumento no peso corporal, independentemente do tipo de ração consumida. A ausência de diferença estatística no ganho de peso entre os grupos que receberam ração autoclavada e não autoclavada sugere que a esterilização não teve impacto significativo no crescimento dos animais. Em adição, os dados de consumo total de ração não revelaram diferenças significativas entre os grupos. Logo, a análise da conversão alimentar também não demonstrou diferenças, visto que tanto o peso quanto o consumo foram estatisticamente iguais entre os grupos.

No que diz respeito à produção de NO pelos macrófagos peritoneais, os resultados indicam uma maior produção em camundongos que receberam ração autoclavada em comparação com aqueles que consumiram ração não autoclavada após 48 horas de cultivo. Por fim, a análise histomorfométrica revelou que os camundongos Swiss alimentados com ração autoclavada apresentaram vilosidades significativamente mais longas e criptas mais rasas.

Em resumo, os resultados sugerem que a esterilização por autoclave não afetou adversamente o desempenho de crescimento, consumo alimentar e conversão alimentar dos camundongos. Entretanto, há indícios de que a autoclavagem pode influenciar no aumento da produção de NO pelos macrófagos e promover alterações na morfologia intestinal dos camundongos de laboratório.

O consumo de ração esterilizada pela autoclave não afetou o crescimento, o consumo alimentar e a conversão alimentar de camundongos Swiss e BALB/c Nude. Os resultados obtidos com os camundongos BALB/c Nude indicam que o consumo de ração autoclavada também não afeta o desempenho zootécnico dessa linhagem. Apesar de estudos anteriores não relatarem efeitos adversos da autoclavagem em variáveis zootécnicas (BARSZCZ et al., 2014; FORD, 1977; KURTZ et al., 2018), esperava-se que o consumo de ração pelos animais do grupo com ração autoclavada fosse diferente como forma de adaptação ao menor teor nutricional da dieta (FORD, 1976; MOURA et al., 2020; ZIMMERMAN; WOSTMANN, 1963). Portanto, a autoclavagem não influencia negativamente o crescimento, o consumo e a

capacidade dos animais converterem a ração consumida em ganho de peso dos animais.

Foi observado uma tendência para maior produção de NO pelos macrófagos peritoneais de camundongos alimentados com ração autoclavada após 24 horas de cultivo das células. Essa tendência se tornou estatisticamente significativa após 48 horas de cultivo em ambas as linhagens, indicando que a autoclavagem pode influenciar a capacidade dos macrófagos em produzir NO. A maior diferença na produção de NO após 48 horas sugere que uma população específica de macrófagos, que pode requerer um período mais longo de ativação para expressar e acumular enzimas como a óxido nítrico sintase induzível (iNOS), pode ter sido predominantemente ativada. Esse fenômeno pode ser atribuído à cinética diferencial de expressão da iNOS em populações distintas de macrófagos (MACMICKING; XIE; NATHAN, 1997). Esse resultado, confirma a possível influência do consumo de ração autoclavada em aspectos imunológicos conforme observado em trabalhos anteriores (BARSZCZ et al., 2014). Entretanto, até onde sabemos, nosso achado sobre maior produção de NO é inédito. Acreditamos que a acrilamida produzida pela autoclavagem pode estar associada a essas alterações nos parâmetros imunológicos dos roedores de laboratório (BESARATINIA; PFEIFER, 2006), devido ao consumo de acrilamida aumentar a resposta inflamatória (ACAROZ et al., 2018). Portanto, a esterilização por autoclave pode produzir uma concentração de compostos tóxicos ao organismo que impacta em aspectos imunológicos dos animais de laboratório.

Em relação a histomorfometria intestinal, foi observado que os camundongos alimentados com ração autoclavada apresentaram vilosidades significativamente mais altas e criptas mais rasas em comparação com aqueles que consumiram ração não autoclavada. A altura das vilosidades está correlacionada com a área de absorção de nutrientes e a profundidade das criptas está correlacionada com a taxa de renovação intestinal (QI et al., 2020; YAMAUCHI, 2007). Além disso, parece existir uma correlação negativa entre a altura das vilosidades e a profundidade das criptas, apoiando o conceito do mecanismo de feedback entre vilosidades e criptas intestinais (ROFFLER et al., 2003). As dimensões das vilosidades e criptas refletem as condições nutricionais. Foi observado que o intestino médio da *Drosophila melanogaster* se redimensiona plasticamente após mudanças na composição da dieta (BONFINI et al., 2021). Portanto, é possível que o consumo de ração autoclavada estimule alterações morfológicas que aumentem a eficiência na absorção de nutrientes. Esse resultado

pode explicar por que os camundongos que consumiram ração esterilizada por autoclave não apresentaram redução no desempenho zootécnico, mesmo sem aumentar o consumo de ração como forma de adaptação.

Reconhecemos que nosso estudo se concentrou em apenas duas linhagens de camundongos, limitando a generalização dos resultados para outras espécies e linhagens. Entretanto, este trabalho abrange uma variedade de parâmetros, desde o desempenho de crescimento até a análise histomorfométrica intestinal, ampliando nossa compreensão do impacto da ração autoclavada em camundongos de laboratório. Destacamos resultados inéditos relacionados ao desempenho zootécnico de camundongos BALB/c Nude, à produção de NO por macrófagos peritoneais e às alterações na morfologia intestinal.

7. CONCLUSÃO

A autoclavagem da dieta não prejudicou o desempenho de crescimento e o consumo e a conversão alimentar dos camundongos Swiss e BALB/c Nude. No entanto, observou-se uma maior produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais dos camundongos alimentados com ração autoclavada, indicando um potencial influência na atividade imunológica. Além disso, a análise histomorfométrica revelou alterações na morfologia intestinal, com vilosidades mais longas e criptas mais rasas em camundongos alimentados com ração autoclavada indicando que a composição nutricional da dieta pode influenciar no tamanho das células intestinais. Ressaltamos a necessidade de investigações futuras, especialmente considerando avaliação em diferentes espécies e linhagens de roedores de laboratório.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOLINS, S. et al. The comparative immunology of wild and laboratory mice, *Mus musculus domesticus*. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 14811, 3 maio 2017.

ACAROZ, U. et al. The ameliorative effects of boron against acrylamide-induced oxidative stress, inflammatory response, and metabolic changes in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 118, p. 745–752, ago. 2018.

ALJAHDALI, N.; CARBONERO, F. Impact of Maillard reaction products on nutrition and health: Current knowledge and need to understand their fate in the human digestive system. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 3, p. 474–487, 4 fev. 2019.

ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA. **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. [s.l.] Editora FIOCRUZ, 2006.

BAKER, D. G. Natural Pathogens of Laboratory Mice, Rats, and Rabbits and Their Effects on Research. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 2, p. 231–266, abr. 1998.

BARSZCZ, M. et al. Effect of the Composition and Autoclave Sterilization of Diets for Laboratory Animals on Pellet Hardness and Growth Performance of Mice. **Annals of Animal Science**, v. 14, n. 2, p. 315–328, 1 abr. 2014.

BARTH, K. M.; MCCONNELL, J. C. Performance of Rats Alternately Fed Diets Higher and Lower in Energy or Protein. **The Journal of Nutrition**, v. 97, n. 1, p. 85–89, jan. 1969.

BASIC, M.; BLEICH, A. Gnotobiotics: Past, present and future. **Laboratory Animals**, v. 53, n. 3, p. 232–243, 17 jun. 2019.

BESARATINIA, A.; PFEIFER, G. P. A review of mechanisms of acrylamide carcinogenicity. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 3, p. 519–528, 18 ago. 2006.

BIERI J. Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Committee on Standards for Nutritional Studies. **The Journal of Nutrition**, v. 107, n. 7, p. 1340–1348, jul. 1977.

BIERI, J. G. Second Report of the ad hoc Committee on Standards for Nutritional Studies. **The Journal of Nutrition**, v. 110, n. 8, p. 1726, ago. 1980.

BLACK, S.; MCKIBBIN, J. M.; ELVEHJEM, C. A. Use of Sulfaguanidine in Nutrition Experiments. **Experimental Biology and Medicine**, v. 47, n. 2, p. 308–310, 1 jun. 1941.

BONFINI, A. et al. Multiscale analysis reveals that diet-dependent midgut plasticity emerges from alterations in both stem cell niche coupling and enterocyte size. **eLife**, v. 10, 23 set. 2021.

BRATTON, A. C.; MARSHALL, E. K. A NEW COUPLING COMPONENT FOR SULFANILAMIDE DETERMINATION. **Journal of Biological Chemistry**, v. 128, n. 2, p. 537–550, maio 1939.

BRYDA, E. C. The Mighty Mouse: the impact of rodents on advances in biomedical research. **Missouri medicine**, v. 110, n. 3, p. 207–11, 2013.

CARUSO, M.; DEMONTE, A.; NEVES, V. A. Histomorphometric study of role of lactoferrin in atrophy of the intestinal mucosa of rats. **Health**, v. 04, n. 12, p. 1362–1370, 2012.

CAVALCANTI, W. B.; BEHNKE, K. C. Effect of Composition of Feed Model Systems on Pellet Quality: A Mixture Experimental Approach. I. **Cereal Chemistry**, v. 82, n. 4, p. 455–461, 29 jul. 2005.

CREES, S. J. ICLAS Guidelines on the Selection and Formulation of Diets for Animals in Biomedical Research. **Food and Chemical Toxicology**, v. 27, n. 1, p. 66–67, jan. 1989.

DIRSCH, V.; STUPPNER, H.; VOLLMAR, A. The Griess Assay: Suitable for a Bio-Guided Fractionation of Anti-Inflammatory Plant Extracts? **Planta Medica**, v. 64, n. 05, p. 423–426, 4 jun. 1998.

EXON, J. H. A Review of the Toxicology of Acrylamide. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, v. 9, n. 5, p. 397–412, dez. 2006.

FLANAGAN, S. P. 'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. **Genetical Research**, v. 8, n. 3, p. 295–309, 14 dez. 1966.

FORD, D. J. The effect of methods of sterilization on the nutritive value of protein in a commercial rat diet. **British Journal of Nutrition**, v. 35, n. 2, p. 267–276, 25 mar. 1976.

FORD, D. J. Effect of autoclaving and physical structure of diets on their utilization by mice. **Laboratory Animals**, v. 11, n. 4, p. 235–239, 1 out. 1977.

GRAHAM, A. L. Naturalizing mouse models for immunology. **Nature Immunology**, v. 22, n. 2, p. 111–117, 25 fev. 2021.

GREENFIELD, H.; BRIGGS, G. M. Nutritional Methodology in Metabolic Research with Rats. **Annual Review of Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 549–572, jun. 1971.

GRIESS, P. Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt „Ueber einige Azoverbindungen”. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 12, n. 1, p. 426–428, 28 jan. 1879.

GUÉNET, J.-L.; ORTH, A.; BONHOMME, F. Origins and Phylogenetic Relationships of the Laboratory Mouse. Em: **The Laboratory Mouse**. [s.l.] Elsevier, 2012. p. 3–20.

HIRAYAMA, D.; IIDA, T.; NAKASE, H. The Phagocytic Function of Macrophage-Enforcing Innate Immunity and Tissue Homeostasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, p. 92, 29 dez. 2017.

KIERDORF, K. et al. Development and function of tissue resident macrophages in mice. **Seminars in Immunology**, v. 27, n. 6, p. 369–378, dez. 2015.

KING H. The growth and variability in the body weight of the albino rat. **The Anatomical Record**, v. 9, p. 751–776, 1915.

KLAUNIG, J. E. Acrylamide Carcinogenicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 15, p. 5984–5988, 1 ago. 2008.

KLURFELD, D. M.; GREGORY, J. F.; FIOROTTO, M. L. Should the AIN-93 Rodent Diet Formulas be Revised? **The Journal of Nutrition**, v. 151, n. 6, p. 1380–1382, jun. 2021.

KURTZ, D. M. et al. Acrylamide Production in Autoclaved Rodent Feed. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, 2018.

MACMICKING, J.; XIE, Q.; NATHAN, C. NITRIC OXIDE AND MACROPHAGE FUNCTION. **Annual Review of Immunology**, v. 15, n. 1, p. 323–350, abr. 1997.

MOROZOVA, M. V. et al. Autoclaved Diet with Inactivated Spores of *Bacillus* spp. Decreased Reproductive Performance of *Muc2^{-/-}* and *Muc2^{+/-}* Mice. **Animals**, v. 12, n. 18, p. 2399, 13 set. 2022.

MOURA, A. M. A. DE et al. Types of sterilization in feed containing different lipidic sources for golden hamster (*Mesocricetus auratus*). **Ciência Animal Brasileira**, v. 21, 2020.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient Requirements of Laboratory Animals**,. Washington, D.C.: National Academies Press, 1995.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Guide for the Care and Use of Laboratory Animals**. Washington, D.C.: National Academies Press, 2011.

NEHLS, M. et al. New member of the winged-helix protein family disrupted in mouse and rat nude mutations. **Nature**, v. 372, n. 6501, p. 103–107, nov. 1994.

QI, D. et al. Repair and regeneration of small intestine: A review of current engineering approaches. **Biomaterials**, v. 240, p. 119832, maio 2020.

REEVES, P. G. AIN-76 Diet: Should We Change the Formulation? **The Journal of Nutrition**, v. 119, n. 8, p. 1081–1082, ago. 1989.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. 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. **The Journal of Nutrition**, v. 123, n. 11, p. 1939–1951, nov. 1993.

ROFFLER, B. et al. Intestinal Morphology, Epithelial Cell Proliferation, and Absorptive Capacity in Neonatal Calves Fed Milk-Born Insulin-Like Growth Factor-I or a Colostrum Extract. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 5, p. 1797–1806, maio 2003.

TUŚNIO, A. et al. Thermal sterilization affects the content of selected compounds in diets for laboratory animals. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v. 23, n. 4, p. 351–360, 27 nov. 2014.

TWADDLE, N. C. et al. Autoclave Sterilization Produces Acrylamide in Rodent Diets: Implications for Toxicity Testing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 13, p. 4344–4349, 1 jun. 2004.

VINEY, M.; RILEY, E. M. The Immunology of Wild Rodents: Current Status and Future Prospects. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 14 nov. 2017.

YAMAUCHI, K. Review of a histological intestinal approach to assessing the intestinal function in chickens and pigs. **Animal Science Journal**, v. 78, n. 4, p. 356–370, 9 ago. 2007.

YUAN, J.; HE, C. C. The Effect of Clean and Microbiota-Free Environment on Host Immune Response. **Journal of Environment and Health Science**, v. 3, n. 2, p. 1–5, 2 maio 2017.

ZHAO, M.; ZHANG, B.; DENG, L. The Mechanism of Acrylamide-Induced Neurotoxicity: Current Status and Future Perspectives. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, 25 mar. 2022.

ZIMMERMAN, D. R.; WOSTMANN, B. S. Vitamin Stability in Diets Sterilized for Germfree Animals. **The Journal of Nutrition**, v. 79, n. 3, p. 318–322, 1 mar. 1963.