

EFEITO MACHO NA INDUÇÃO DO ESTRO EM RATAS *WISTAR* (*Rattus norvegicus*)

Vânia Gomes de Moura Mattaraia¹
Ana Paula Rocha da Silva¹
Denise Rangel da Silva Sartori²
Maria de Fátima Carvalho Lins Fernandes Távora³
Ubimara Pereira Rodrigues¹
Virginia Barreto Moreira³
Ana Silvia Alves Meira Tavares Moura^{4*}

RESUMO

O objetivo foi avaliar a indução de ratas *Wistar* ao estro de duas diferentes formas: pela presença de machos adultos vasectomizados (MV) e pelo odor do macho (OM), tendo como controle positivo, machos comprovadamente férteis (MF) e controle negativo, ausência de macho e de odor do macho (SM). Sessenta fêmeas foram alojadas individualmente em gaiolas e distribuídas em quatro tratamentos contendo 15 fêmeas cada. No tratamento MV, cada fêmea foi exposta à presença de um macho adulto vasectomizado. No tratamento OM cada fêmea foi exposta ao odor do macho, ou seja, foi colocada diariamente em contato direto com maravalha proveniente de uma gaiola de macho adulto. No grupo MF, cada fêmea foi colocada diretamente com um macho, comprovadamente, fértil. No grupo SM, as fêmeas permaneceram sem contato com macho ou com maravalha de macho. Em todos os grupos, as fêmeas foram submetidas ao tratamento durante cinco dias consecutivos. Diariamente, foi coletada a secreção vaginal de todas as fêmeas, pelo método de esfregaço, para identificar a fase do ciclo estral. Para comparar os tratamentos foi utilizada a análise de sobrevivência. Houve tendência ($P=0,0971$) dos grupos se diferenciarem em relação ao número de dias para apresentar estro. Todas as fêmeas dos grupos OM e MF manifestaram estro dentro do período de quatro dias, alcançando diariamente os seguintes percentuais: 40,0; 13,3; 20,0 e 26,7% e 20,0; 20,0; 20,0 e 40,0% , respectivamente. No tratamento SM, 13 fêmeas (86,7%) apresentaram estro no período com percentuais diários de: 20,0; 20,0; 26,7 e 20,0%. No tratamento MV, 11 fêmeas (73,3%) apresentaram estro ao longo dos quatro dias examinados, com os seguintes percentuais diários: 6,7; 26,7; 13,3 e 26,7%. Não é possível afirmar que a exposição de fêmeas *Wistar* nulíparas a machos vasectomizados ou ao odor do macho na maravalha seja eficaz para induzir o estro.

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

¹ Pesquisadora Científica - Biotério Central - Instituto Butantan, SP - Brasil

² Professora Doutora do Departamento de Fisiologia - Instituto de Biociências / UNESP/ Botucatu – SP - Brasil

³ Biotecnóloga – Instituto Butantan – São Paulo – SP - Brasil

⁴ Professora Doutora do Departamento de Produção Animal – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia / UNESP / Botucatu – SP-Brasil.

* Correspondência: Ana Silvia Alves Meira Tavares Moura. Departamento de Produção Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, 18618-000 – Botucatu – SP, Telefone: 14 3811-7185. Fax: 14 3811 7180. anamoura@fca.unesp.br

**MALE EFFECT IN THE INDUCTION OF ESTRUS IN *WISTAR* RATS
(*Rattus norvegicus*)**

ABSTRACT

The objective was to evaluate the induction of estrus in *Wistar* female rats in two ways: the presence of vasectomized males (MV) and the presence of male odor from the bedding (OM). The presence of intact males was used as a positive control (MF) and the absence of males and male odor as a negative control (SM). Sixty females were caged individually and assigned to one of four treatments with 15 females each. In the MV treatment, each female was exposed to an adult vasectomized male. In the OM treatment, each female was exposed to male odor, i.e., she was placed daily in direct contact with bedding from an adult male. In the MF treatment each female was directly exposed to a certified fertile male. In the SM treatment females had no contact with males or male bedding. In all groups females were exposed to treatment for five consecutive days. All the females had their vaginal smear collected for estrous cycle phase determination. A survival analysis was employed to compare treatments. Treatments tended ($P=0.0971$) to differ in relation to the number of days to present estrus. All the females from treatments OM and MF achieved estrus within the four-day period, reaching the following daily percentages: 40.0, 13.3, 20.0 and 26.7% and 20.0; 20.0; 20.0 and 40.0% for OM and MF, respectively. In the SM treatment, 13 females (86.7%) showed estrus in the same period with daily percentages of: 20.0, 20.0, 26.7 and 20.0%. In the MV treatment 11 females (73.3%) showed estrus along the four readings with the following daily percentages: 6.7, 26.7, 13.3 and 26.7%. It is not possible to affirm that the exposition of nuliparous female *Wistar* to vasectomized males or to adult male odor in bedding is effective for estrous induction.

Key words: estrous, synchronization, *Wistar* rat, Whitten effect.

**EFEITO MACHO EN LA INDUCCIÓN DEL ESTRO EN RATAS *WISTAR*
(*Rattus norvegicus*)**

RESUMEN

El objetivo fue evaluar la inducción al estro de ratas *Wistar* de dos diferentes formas: por la presencia de machos adultos vasectomizados (MV) y por el olor del macho (OM), habiendo como control positivo, machos comprobadamente fértiles (MF) y como control negativo, ausencia de macho y de olor del macho (SM). Sesenta hembras fueron alojadas individualmente y distribuidas en cuatro tratamientos con 15 hembras cada uno. En el tratamiento MV, cada hembra fue expuesta a la presencia de un macho adulto vasectomizado. En el tratamiento OM cada hembra fue expuesta al olor del macho, o sea, fue colocada diariamente en contacto directo con aserrín (residuos de madera) proveniente de una jaula de un macho adulto. En el tratamiento MF, cada hembra fue colocada directamente con un macho comprobadamente fértil. En el tratamiento SM, las hembras permanecieron sin contacto con el macho o con aserrín de macho. En todos los grupos las hembras fueron sometidas al tratamiento durante cinco días consecutivos. Diariamente, fue colectada la secreción vaginal de todas las hembras, por el método de frotación, para identificar la fase del ciclo estral. Para comparar los tratamientos, fue utilizado el análisis de sobre vivencia. Hubo una tendencia ($P=0,0971$) de diferenciación entre los grupos, con relación al número de días para presentar estro. Todas las hembras de los tratamientos OM y MF alcanzaron estro

durante el periodo estudiado de cuatro días, alcanzando diariamente los siguientes porcentajes: 40,0; 13,3; 20,0 y 26,7% y 20,0; 20,0; 20,0 y 40,0% para OM y MF, respectivamente. En el tratamiento SM, 13 hembras (86,7%) presentaron estro en el mismo periodo con un porcentaje diario de 20,0; 20,0; 26,7 y 20,0%. En el tratamiento MV 11 hembras (73,3%) presentaron estro a lo largo de cuatro lecturas con los siguientes valores diarios: 6,7; 26,7; 13,3 y 26,7%. No es posible afirmarse que la exposición de hembras *Wistar* nulíparas a machos adultos vasectomizados o al olor del macho en el aserrín sea efectiva para inducir el estro.

Palabras claves: estro, sincronización, rata *Wistar*, efecto *Whitten*.

INTRODUÇÃO

A rata atinge a maturidade sexual em torno dos sessenta dias de idade (1), porém, na prática, aguarda-se até noventa dias, quando a fêmea *Wistar* pesa aproximadamente 250g, para realizar o primeiro acasalamento. O ciclo estral dura de quatro a cinco dias e possui quatro fases (diestro, proestro, estro e metaestro), que podem ser observadas pela análise citológica da secreção vaginal. Classicamente, estas fases podem ser identificadas de acordo com a proporção entre três tipos celulares presentes no esfregaço vaginal (2, 3).

As fêmeas dos mamíferos, especialmente daqueles que vivem em grandes grupos, estão envoltas em um ambiente social muito rico e complexo, repletos de estímulos sensitivos, provenientes dos demais componentes do grupo (4). No camundongo, a presença de fêmeas adultas atrasa a puberdade de fêmeas jovens. Em alcateias, embora as fêmeas subordinadas apresentem cio e até cortejem os machos, elas não copulam, a menos que a fêmea dominante seja removida do grupo (5). A identificação e o reconhecimento dos indivíduos ocorrem pelo cheiro inato de cada espécie, resultante da liberação de substâncias químicas denominadas de feromônios. Feromônios são produtos químicos temporários liberados pelos animais, que causam mudanças comportamentais, fisiológicas e, possivelmente, psicológicas em outros membros da mesma espécie. Podem influenciar o desempenho reprodutivo dos ratos e serem usados para ajudar o investigador (6).

A manipulação hormonal do ciclo reprodutivo murino é, agora, prática comum na criopreservação de embriões, limpeza sanitária de colônias e transgênese. A sincronização do ciclo estral e a programação do parto em ratas são requisitos indispensáveis para a aplicação destas técnicas e para a produção de animais para a pesquisa. Embora a sincronização do estro em grupos homossexuais tenha sido descrita há três décadas (7), mais recentemente a variabilidade do ciclo estral tem sido apontada como entrave à sincronização (8). A indução do estro pode ser realizada por diversos métodos: efeito *Whitten*, indução hormonal pela administração de gonadotropina coriônica equina (eCG), ou usando o hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH) e pela presença de machos vasectomizados. O efeito *Whitten* caracteriza-se pelo sincronismo do ciclo estral, quando fêmeas de camundongo alojadas em grupos homossexuais e apresentando anestro ou diestro prolongado, são expostas a um macho ou ao odor de sua urina, promovendo a liberação de gonadotrofina e ativando o ciclo ovariano de forma sincronizada (9).

Este trabalho teve por objetivo avaliar a indução ao estro de fêmeas *Wistar* de duas diferentes formas: pela presença de machos adultos vasectomizados ou pelo odor do macho na maravalha.

MATERIAL E MÉTODOS

Local e Instalações

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

Animais e Manejo Geral

O modelo biológico foi o rato *Wistar*, com animais oriundos da colônia de multiplicação do Setor de Ratos, do Biotério Central do Instituto Butantan. Os animais possuíam padrão sanitário controlado, foram mantidos em gaiolas de polipropileno de 46 x 31 x 21cm, que permitiram livre acesso à água potável e à ração. As gaiolas foram forradas com cama de maravalha autoclavada. A rotina de manejo dos animais compreendeu duas trocas semanais da gaiola e água fresca três vezes por semana. A ração comercial peletizada (Nuvital[®] para roedores) foi oferecida *ad libitum*. De acordo com o fabricante, a formulação obedeceu às recomendações do National Research Council (10) e Morrison et al. (11).

Delineamento Experimental

Produziram-se 60 fêmeas com diferença máxima de dois dias de idade, as quais foram mantidas em ninhadas de oito filhotes, desde o nascimento até o desmame, que ocorreu aos 21 dias de idade. A partir desta idade, continuaram em grupos homossexuais de seis fêmeas por gaiola, até a idade de 90 dias. Durante o período compreendido entre o desmame e o acasalamento, as fêmeas e os machos foram mantidos em salas separadas.

Aos 90 dias as fêmeas foram identificadas, alojadas em gaiolas individuais e aleatoriamente distribuídas em quatro grupos. No primeiro grupo cada fêmea foi exposta à presença de um macho adulto vasectomizado (MV). No segundo grupo cada uma foi exposta ao odor do macho (OM), ou seja, foi colocada diariamente em uma gaiola contendo maravalha retirada de uma gaiola de macho adulto. No terceiro grupo, o controle positivo, cada fêmea foi colocada diretamente na presença de um macho comprovadamente, fértil (MF). No último grupo, controle negativo, as fêmeas permaneceram sem contato com macho ou com maravalha de macho (SM). Em todos os grupos, as fêmeas foram expostas ao tratamento por cinco dias consecutivos.

A partir do dia 2, todas as fêmeas foram submetidas à coleta da secreção vaginal pelo método de esfregaço para identificar a fase do ciclo estral, a partir das 08h00min. A classificação baseou-se na proporção relativa de três tipos de células: células epiteliais, células corneificadas, e leucócitos (8, 12). Após a coleta, procedeu-se à leitura imediata das lâminas não coradas a fresco, em microscópio ótico, sem a utilização das lentes do condensador (12, 13). O uso da objetiva de aumento de 10 vezes permitiu a análise da proporção entre os três tipos celulares presentes no material, enquanto a objetiva de aumento de 40 vezes permitiu a identificação de cada um dos tipos celulares. As células epiteliais são arredondadas e nucleadas, as irregulares e sem núcleo são as corneificadas e as redondas e pequenas, os leucócitos.

A análise de sobrevivência foi empregada para comparar os tratamentos em relação ao número de dias necessários ao aparecimento do primeiro estro no intervalo de tempo estudado, com o auxílio do procedimento *LIFETEST* do SAS (14).

Produção de Machos e Vasectomia

Foram produzidos 50 filhotes machos, que após o desmame foram mantidos em ninhadas compostas de cinco animais cada. Deste total, 18 animais foram vasectomizados aos 30 dias de idade, seguindo o esquema descrito na Figura 1. Todos os machos foram previamente acasalados com o intuito de ser certificada, ou não, sua fertilidade, no caso dos machos intactos ou vasectomizados, respectivamente.

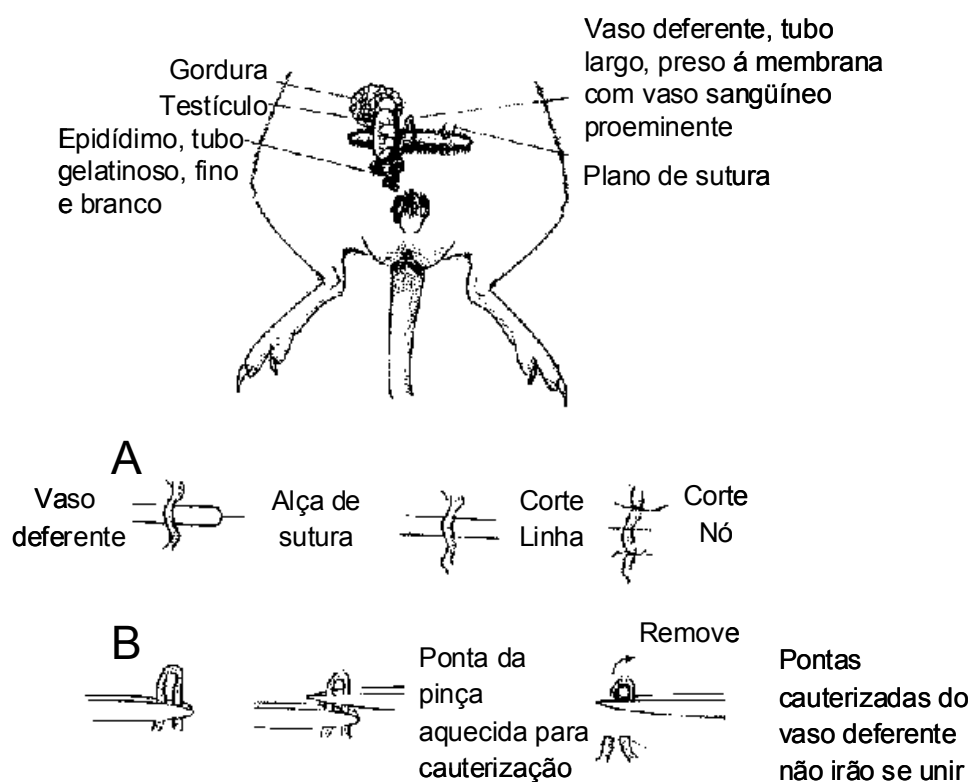


Figura 1. Esquema de vasectomia (modificado de Hogan, B., *et al.*. In: *Manipulating the Mouse Embryo – Second Edition* - 1994)

Para realização da vasectomia, os animais foram anestesiados por via intra-peritoneal com ketamina (7%) e xilasina (0,3%) na proporção de 2:1 mL, com 0,2 mL/100 g de peso da solução. Posicionados na mesa cirúrgica em decúbito dorsal, tendo suas extremidades fixadas com fita adesiva, foram tricotomizados e submetidos à antissepsia. Uma incisão com 0,5cm de comprimento foi feita com lâmina de bisturi, a uma distância de aproximadamente 1cm acima do pênis, seguindo a linha mediana, abrangendo pele e aponeurose. Realizou-se a fixação da musculatura abdominal com as pinças de Allis, para tracionar a parede abdominal, com o intuito de facilitar o processo. Chegou-se aos ductos deferentes, cada ducto foi separado da membrana mesentérica e apreendido com uma pinça em dois pontos distanciados aproximadamente em 5mm. Os dois pontos foram seccionados e termo-cauterizados. A sutura foi realizada com fio nº15, em dois planos, com pontos separados (Figura 1). Os animais foram levados para a área tranquila do laboratório. A temperatura ambiente foi controlada entre 30 e 33°C. Durante a recuperação, os animais foram dispostos em camas de papel toalha

que não aderiram à ferida cirúrgica. Sempre foi mantido um animal por gaiola para evitar traumas ou até canibalismo. Não foi necessário o uso de antibióticos, porque foi utilizada técnica estéril de manipulação. Nas primeiras horas após o procedimento cirúrgico, observou-se o comportamento, a temperatura anal, consumo de água e ração. O alimento foi disponibilizado, colocando-se ração umedecida no fundo da caixa, e água *ad libitum*. Foram usados analgésicos para alívio da dor.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diariamente, pelo período de cinco dias, 60 lâminas de esfregaço vaginal foram examinadas e classificadas quanto à fase do ciclo estral em que se encontravam as fêmeas (Tabela 1). Observou-se, independentemente do tratamento ou da leitura, maior incidência total de diestros do que das demais fases, indicando que esta foi a fase mais longa do ciclo estral destas fêmeas. Por outro lado, em quase um terço das fêmeas (19 em 60) não foi registrado proestro nos cinco dias de observação. Duas fêmeas do grupo MV não apresentaram estro, nos demais grupos todas as fêmeas apresentaram estro pelo menos uma vez. Com exceção de uma fêmea do grupo OM que apresentou estro em dois dias consecutivos, um dia de estro foi seguido de metaestro e de diestro. Mais de 80% das fêmeas (49 em 60), variando de 11 a 14 fêmeas por grupo, apresentaram diestro em dois dias consecutivos.

Sete fêmeas apresentaram dois estros com intervalo de quatro dias (no primeiro e no quinto dias), quatro do grupo OM e uma de cada um dos demais grupos. Em virtude desta repetição de estros por algumas fêmeas no período de cinco dias, apenas as quatro primeiras leituras foram consideradas na análise de sobrevivência cujo objetivo foi comparar os tratamentos quanto ao número de dias necessários ao aparecimento do estro.

Tabela 1. Sequências do ciclo estral das fêmeas em cinco dias consecutivos por tratamento

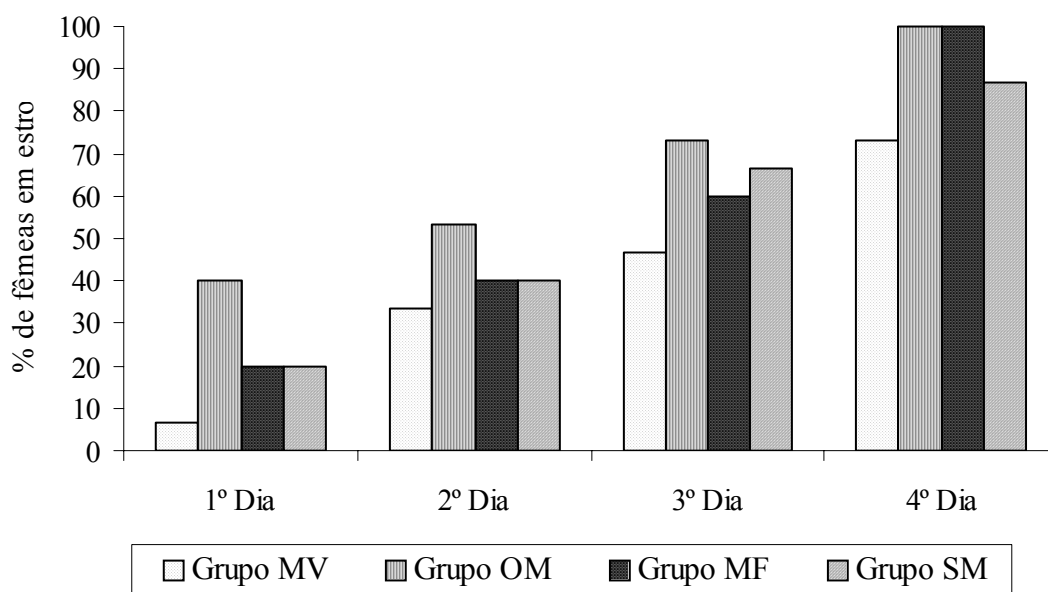
Fêmea	Sem macho (dias) ¹					Odor de macho (dias)					Macho vasectomizado (dias)					Macho fértil				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1	E	M	D	D	E	D	D	P	E	M	D	E	M	D	D	D	D	P	E	M
2	D	P	E	M	D	E	M	D	D	E	P	M	M	D	D	M	D	P	E	M
3	D	P	E	M	D	E	M	D	D	P	D	P	E	M	D	E	M	D	D	E
4	D	D	P	E	M	D	D	P	E	M	D	D	E	M	D	D	D	E	M	D
5	D	P	E	M	D	D	E	M	D	D	D	D	P	E	M	D	P	E	M	D
6	D	D	P	E	M	E	M	D	D	P	P	E	M	D	D	D	D	P	E	M
7	E	M	D	D	P	E	M	D	D	E	P	M	D	D	E	P	E	M	D	D
8	D	E	M	D	D	D	P	E	M	D	D	E	M	D	D	D	P	E	M	D
9	M	D	D	P	E	E	M	D	D	E	D	D	P	E	M	D	D	P	E	M
10	P	E	M	D	D	D	D	P	E	M	M	D	D	P	E	E	M	D	D	P
11	E	M	D	D	P	E	M	D	D	E	E	M	D	D	E	P	E	M	D	P
12	M	D	D	E	M	P	E	M	D	D	D	P	M	D	D	D	D	P	E	M
13	D	D	E	M	D	D	D	P	E	M	D	E	M	D	D	P	E	M	D	D
14	D	E	M	D	D	D	P	E	E	M	M	D	D	E	M	D	D	P	E	M
15	M	D	D	E	M	D	P	E	M	D	D	D	P	E	M	E	M	D	D	P

¹P= proestro, E = estro, D = diestro, M = metaestro

Todas as fêmeas dos grupos OM e MF alcançaram estro durante o período de 4 dias (Figura 2). No grupo SM, 13 fêmeas (86,7%) apresentaram estro no período e no grupo MV, 11 fêmeas (73,3%) apresentaram estro ao longo das quatro leituras avaliadas. O grupo OM foi

o único em que, já no primeiro dia, 40% das fêmeas apresentaram-se em estro. No entanto, de acordo com o teste *log rank* houve apenas tendência ($P=0,0971$) de os grupos se diferenciarem em relação ao número de dias para apresentar estro. Portanto, não é possível afirmar com segurança que o odor do macho tenha favorecido a indução do ciclo estral destas fêmeas. Este resultado está de acordo com a alegação de que o efeito *Whitten* não é tão pronunciado em ratos quanto em camundongos (15). Por outro lado, Schank (8) constatou que a variabilidade do ciclo estral em ratas é um entrave à sincronização de pares de fêmeas. Caso se confirmasse sua eficácia, o uso de maravalha com o odor de macho seria uma opção simples e prática para a indução do estro em ratas e possível sincronização de grupos de fêmeas.

O macho vasectomizado deveria representar o mesmo estímulo para as fêmeas que o macho intacto, mas este não parece ter sido o caso, tendo em vista que o grupo de fêmeas submetidas aos machos vasectomizados apresentaram a menor incidência de estros (Figura 2). Além disto, a realização das cirurgias para a preparação dos machos vasectomizados consumiu tempo e recursos materiais. Estas constatações não encorajam o prosseguimento de estudos para o uso de machos vasectomizados na indução do estro em ratas. Foi demonstrado que fêmeas com implantes de 20mg de testosterona apresentavam feromônios masculinos na urina e que a urina de machos castrados não teve influência no ciclo estral (16).



MF = macho fértil; MV = macho vasectomizado; OM = odor do macho; SM = sem macho

Figura 2. Frequência acumulada de estro em quatro dias consecutivos de avaliação do esfregaço vaginal de ratas *Wistar* nulíparas.

CONCLUSÃO

A diferença no número de dias para apresentar estro entre os tratamentos experimentais foi tênue, portanto não é possível recomendar o uso da maravalha com o odor do macho para induzir o estro em fêmeas de rato. No entanto, novos estudos devem ser realizados com o objetivo de desenvolver técnicas de indução e sincronização do estro em ratas, uma vez que, no dia-a-dia dos biotérios, há necessidade de produção de grandes grupos

de indivíduos com nascimentos sincronizados e é muito grande o número de fêmeas para acasalar.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Professor Doutor Francisco Stefano Wechsler pelo auxílio na realização das análises estatísticas.

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu – UNESP, em 02 de março de 2005 (protocolo n. 100/2004).

REFERÊNCIAS

1. Hafez ESE, editor. Reproduction and breeding techniques for laboratory animals. Philadelphia: Lea & Fabiger; 1970.
2. Hoar W, Hickman CP. Ovariectomy and the estrous cycle of the rat. In: General comparative physiology. 2nd ed. New Jersey: Prentice-Hall; 1975. p.260-5.
3. Mies-Filho A. Reprodução dos animais. 6ª ed. Porto Alegre: Sulina; 1987.
4. Martin GB. Social-sexual signals and reproduction in mammals: an overview. In: Anais do Curso Internacional sobre Feromonas y Bioestimulación Sexual; 2002, Ciudad de México. Ciudad de México; 2002. p.11-28.
5. Alcock J. Animal behavior: an evolutionary approach. 5ª ed. Sunderland: Sinouer Associates; 1993.
6. McClintock MK. Estrous synchrony: modulation of ovarian cycle length by female pheromones. *Physiol Behav.* 1984; 32: 701-5.
7. McClintock MK. Estrous synchrony and its mediation by airborne chemical communication (*Rattus norvegicus*). *Horm Behav.* 1978; 10: 264-76.
8. Schank JC. Do Norway rats (*Rattus norvegicus*) synchronize their estrous cycles? *Physiol Behav.* 2001; 72: 129-39.
9. Whitten WK. Modification of the estrous cycle of the mouse by external stimuli associated with the male. *J Endocrinol.* 1956; 13: 399-404.
10. National Research Council. Nutrient requirements of laboratory animals. 3ªed. Washington D.C.: National Academy Press; 1995.
11. Morrison AR, Evans HL, Ator NA, Nakamura RK, editors. Methods and welfare considerations in behavioral research with animals: report of a National Institutes of Health Workshop. Washington: U.S. Government Printing Office; National Institutes of Mental Health; 2002. (NIH Publication No. 02-5083).
12. Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol* 2002; 62: 609-14.

13. Silva-Filho AR. Citologia vaginal a fresco na gravidez: correlação com a citologia corada pela técnica de Papanicolau. Rev Bras Ginecol Obstet. 2004; 26: 509-15.
14. SAS Institute. SAS/STAT: user's guide. release 9.1.3. Cary; 2003. CD-ROM.
15. Sharp PE, La Regina MC. The laboratory rat. Boca Raton: CRC Press; 1998.
16. Howard WE, Marsh RE. Olfaction in rodent control. In: Proceedings the 4th Vertebrate Pest Conference; 1970, Sacramento. Sacramento: California Vertebrate Pest Committee; 1970. p.64-70.

Recebido em: 19/02/2009

Aceito em: 16/09/2009