



Original / *Investigación animal*

Curvas de referencia para valorar el crecimiento físico de ratas machos Wistar

Marco Cossio-Bolaños¹, Rossana Gómez Campos^{2,3}, Rodrigo Vargas Vitoria¹, Rosalvo Tadeu Hochmuller Fogaça⁴ y Miguel de Arruda²

¹Universidad Católica del Maule. Departamento de Ciencias de la Actividad física. Talca. Chile. ²Universidad Estadual de Campinas. Campinas. SP. Brasil. ³Universidad La Frontera. Facultad de Educación y Humanidades. Temuco. Chile. ⁴Universidad Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Departamento de Fisiologia. Curitiba. Brasil.

Resumen

Introducción: Las ratas Wistar son una de las cepas más populares y utilizadas cotidianamente para la investigación en el laboratorio sirviendo como una importante herramienta de investigación, por lo que, exige el control estricto de variables como la edad, el sexo y el peso corporal, y de esta forma poder extrapolar los resultados al modelo humano.

Objetivo: Desarrollar curvas de referencia para valorar el crecimiento físico de ratas machos Wistar en función de la edad cronológica y la maduración somática desde una perspectiva no-invasiva.

Metodología: Fueron estudiadas 731 ratas machos Wistar de forma transversal. Se evaluó la edad, peso corporal y la superficie corporal. Se utilizó el método LMS para construir curvas de percentil en función del peso y la maduración somática.

Resultados: Las curvas de crecimiento físico propuestas sirven para realizar el seguimiento del crecimiento físico y el diagnóstico del estado nutricional de ratas machos de cepa Wistar. Los puntos de corte propuestos son: P3, P10, P25, P50, P75, P90 y P97.

Conclusión: Los resultados sugieren que los científicos de diversas áreas puedan usar tales referencias, con el objetivo de extrapolar las fases del crecimiento somático de la rata de laboratorio al modelo humano y es una alternativa no-invasiva para valorar el crecimiento y el estado nutricional.

(Nutr Hosp. 2013;28:2151-2156)

DOI:10.3305/nh.2013.28.6.6659

Palabras clave: *Curvas. Crecimiento. Peso. Rata. Laboratorio.*

REFERENCE CURVES FOR ASSESSING THE PHYSICAL GROWTH OF MALE WISTAR RATS

Resumen

Introduction: Wistar rats are one of the most popular strains routinely used for research in the laboratory to serve as an important research tool, so it requires strict control of variables such as age, sex and body weight, and Thus to extrapolate the results to the human model.

Objective: To develop reference curves for assessing the physical growth of male Wistar rats according to chronological age and somatic maturation from a non-invasive.

Methodology: The subjects studied were 731 male Wistar rats transversely. We assessed age, body weight and body surface. LMS method was used to construct percentile curves based on weight and somatic maturation. Results: The proposed physical growth curves are used to track the physical growth and nutritional status diagnosis of male Wistar rats. Budgets by cutting points are: P3, P10, P25, P50, P75, P90 and P97.

Conclusion: The results suggest that scientists from different areas can use such references, in order to extrapolate somatic growth phases of the laboratory rat and the human model is a non-invasive alternative to assess growth and nutritional status.

(Nutr Hosp. 2013;28:2151-2156)

DOI:10.3305/nh.2013.28.6.6659

Key words: *Curves. Growth. Weight. Rat. Lab.*

Correspondencia: Marco A. Cossio Bolaños.
Avda. San Miguel, 3605. Talca.
E-mail: mcossio1972@hotmail.com

Recibido: 23-IV-2013.
Aceptado: 18-VII-2013.

Abreviaturas

COBEA: Colegio Brasileiro de Experimentación Animal.

ETM: Error Técnico de Medida.

SC: superficie corporal.

PV: peso vivo.

PVC: Pico de Velocidad de Crecimiento.

Introducción

El crecimiento físico en general es definido como el aumento en el número y tamaño de las células que componen los diversos tejidos del organismo^{1,2}. Está determinado por factores biológicos intrínsecos sensibles a múltiples contingencias mesológicas que modulan la expresión del potencial genético³.

En el ser humano, su valoración es realizada a través de curvas de crecimiento; pues muchas organizaciones gubernamentales y organismos de las naciones unidas se basan en tablas de crecimiento para medir el bienestar general de las poblaciones, para la formulación de políticas de salud y afines, así como para la planificación de las intervenciones y el seguimiento de su efectividad⁴; sin embargo, en el modelo animal, específicamente en ratas Wistar (*Rattus Norvegicus*) hasta donde conocemos no existe una referencia que permita diagnosticar y monitorizar el crecimiento físico, tanto de forma transversal y/o longitudinal, a pesar de que la literatura reporta algunos intentos de estimación realizando una comparación directa entre las dos especies por los años de promedio que vive el humano y la rata de laboratorio^{5,6}.

Actualmente las ratas Wistar son una de las cepas más populares y utilizadas cotidianamente para la investigación en el laboratorio, por lo que éste mamífero sirve como un organismo modelo para el análisis de un número importante de características biomédicas y toxicológicas^{6,7}, así como para estudiar la nutrición enteral⁸ y parenteral⁹; inclusive es considerado como importante herramienta para la investigación de las condiciones que afectan a los seres humanos y que pueden ser simuladas en ratas¹⁰. De hecho, la investigación de laboratorio en el modelo animal exige el control estricto de algunas variables que permiten conseguir resultados reproducibles¹¹. Estas variables a menudo son la edad, el sexo y el peso corporal, con lo cual, se caracteriza a los grupos de trabajo y se garantiza una posible extrapolación de los resultados al modelo humano.

En general, varios métodos han sido utilizados para la determinación del crecimiento físico de pequeños mamíferos, estos procedimientos comprenden mediciones del tamaño y el crecimiento de ciertas partes del cuerpo^{12,13}, osificación de la epífisis¹⁴ maduración somática¹⁵ y crecimiento y desarrollo de los dientes¹⁶; sin embargo, a nivel nacional e internacional, no se ha estudiado a profundidad el crecimiento físico en mamí-

feros (ratas), puesto que los patrones de crecimiento pueden ser utilizados en situaciones relacionadas a la salud, en el que permitan reflejar las condiciones del estado nutricional en la que se encuentran los roedores, así como identificar el acelerado, normal y lento crecimiento de los mismos. Esto en razón de que muchos tratamientos que se usan y se desarrollan en los laboratorios implican la búsqueda de pérdida, manutención y aumento de peso corporal, así como restricciones e inducciones de dietas, aplicación de procedimientos quirúrgicos, administración de medicamentos y suplementos, efectos del ejercicio físico, entre otras manipulaciones. Por lo tanto, el objetivo del estudio fue desarrollar curvas de referencia para valorar el crecimiento físico de ratas machos Wistar en función de la edad cronológica y la maduración somática desde una perspectiva no-invasiva.

Metodología

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal en 731 ratas machos Wistar. Los animales fueron seleccionados de forma no-probabilística (accidental). Para el estudio se consideró un rango de edad que va desde los 21 hasta los 112 días, con un promedio de peso corporal de $276,5 \pm 111,70$ g (40-479 g) y superficie corporal de $18,9 \pm 7,7$. Los animales provinieron del Bioterio de Departamento de Farmacología de la Universidad Estadual de Campinas (UNICAMP) Sao Paulo, Brasil.

Todos los animales durante la investigación fueron alojados en cajas colectivas de plástico (3 ratas por gayola) viviendo en un ciclo claro/oscuras (12 h/12 h) en un ambiente con temperatura constante ($23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) y con humedad relativa entre 45-65%. El clima en Campinas (Brasil), lugar donde los animales fueron criados presenta una altitud de 677 msnm y el clima es subtropical húmedo. La dotación de los alimentos fue libre y el agua ad libitum y tratados bajo los principios éticos de experimentación animal que rige el COBEA (Colegio Brasileiro de Experimentación Animal) y aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Estadual de Campinas UNICAMP.

Se incluyeron a las ratas que presentaban un rango de edad de 21 hasta los 112 días (21 días después del destete) y a las que no recibieron ningún tipo de tratamiento e intervención física, fisiológica, nutricional, entre otras manipulaciones. Se excluyeron a los animales que presentaban signos de enfermedad y a las que se estresaban en el día a día con sus contrapartes.

Técnicas e instrumentos

La recolección de información se efectuó de julio a octubre (2011) por las mañanas (8.00 a 9.00 am). La valoración del peso corporal (g) de las ratas se realizó a través de una balanza analítica de marca Scaltex

modelo SAC-62, con una precisión de (10-4gramos), siguiendo las recomendaciones de Cossio-Bolaños y cols.¹⁷. El procedimiento consistió en colocar a los animales en un frasco ligero sobre la balanza con el objetivo de evaluar el peso corporal en gramos (g). La evaluación fue repetida dos a tres veces. Todo el proceso de evaluación estuvo a cargo de un evaluador con amplia experiencia, mostrando un Error Técnico de Medida (ETM) inferior al 0,9%. Los valores de ETM se observan en la tabla I.

La superficie corporal fue hallada a través de la ecuación propuesta por Cano-Rabano, Rios-Granja¹⁸, $SC = 0,1 * PV * 0,685$, donde SC = superficie corporal y PV = peso vivo.

La maduración somática de los animales fue determinado a través de la ecuación propuesta por Cossio-Bolaños y cols.¹⁹. Esta ecuación permite el cálculo del Pico de Velocidad de Crecimiento (PVC) de forma transversal. Las variables que se usan son el peso (g) y la edad (días), donde: $[PVC = -5,02 + (0,143 * Edad) - (0,00259 * Peso)]$. Los resultados permiten clasificar en 14 niveles (-3, -2, -1, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10), los que indican el grado de alejamiento y proximidad del PVC de los animales. El cero significa el momento exacto del PVC y los valores ± 1 significan la proximidad y/o alejamiento del PVC en una semana.

Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados a través de la estadística descriptiva de media aritmética, desviación estándar y distribución de percentiles (P3, P10, P25, P50, P75, P90 y P97). La prueba de Kolmogorov-Smirnov (K-S) se aplicó a todas las variables, aunque por separado para cada grupo de edad, con el fin de establecer la normalidad de la distribución.

Se construyeron curvas de percentil de peso corporal por separado en función de la edad cronológica y la

maduración somática (niveles) mediante el método LMS²⁰. La transformación de Box-Cox power fue usada para normalizar los datos en cada edad y nivel. Se aplicó el procedimiento de máxima probabilidad de penalización a efecto de crear tres curvas suaves: L(t) Box-Cox power, M(t) mediana y S(t) Coeficiente de variación. Estos tres parámetros permiten construir la curva en relación a cualquier centil que se desea, para ello es necesario el uso de la fórmula:

$$C100\alpha(t) = M(t) [1 + L(t)S(t)Z\alpha]^{1/L(t)}$$

donde $Z\alpha$ es el desvío normal equivalente para el área α , $C100\alpha(t)$ es el centil correspondiente al $Z\alpha$ equivalente a los grados de libertad para L(t), M(t) y S(t) que miden la complejidad de cada curva ajustada. El método LMS se aplicó para generar patrones de crecimiento físico con el software LMS Chartmaker Pro versión 2.3²¹.

Resultados

El control de calidad de la medición del peso corporal de las ratas se describe en la tabla I. Los valores oscilan desde 0,69 a 0,89%. En edades iniciales se observan valores inferiores de ETM, a partir de los 49 días los valores de ETM se incrementan en un 0,10%.

La tabla II, muestra los valores del peso corporal de ratas machos (g). Estos valores están distribuidos en percentiles en función de la edad cronológica (días). La edad que se consideró fue a partir de los 21 hasta los 112 días de vida. En todos los percentiles, los valores se incrementan con el transcurso de la edad.

La distribución percentilar de los valores del peso corporal (g) en función de la maduración somática (PVC) se observa en la tabla III. Los percentiles pueden ser analizados en función de 13 niveles que oscilan desde -2 hasta 10 semanas. En todos los percentiles los valores del peso corporal se incrementan en función de los niveles.

Los puntos de corte para la tabla II y III y las figuras 1 y 2 se interpretan como: <p3 desnutrición, p3-p10 delgadez, p10-p90 eutrófico, p90-p97 sobrepeso y >p97 obesidad, respectivamente. Las figuras 1 y 2 muestran el crecimiento lineal del peso corporal (g) en función de la edad (días) y en función de la maduración somática (PVC). En ambas figuras se evidencia un similar patrón de crecimiento, resaltando que el p50 a los 112 días fue de 415,10 g (Fig. 1, Tabla II) y en el nivel 10 fue de 413,92 g (Fig. 2, Tabla III).

Discusión

Este estudio proporciona información relevante respecto a la valoración del crecimiento físico de ratas machos Wistar. En este sentido, para proponer las curvas se consideró el peso corporal, cuya medición fue

Tabla I
Error técnico de medida intra-evaluador del peso corporal de ratas macho Wistar

n	Edad (días)	ETM
44	21	0,69
55	28	0,69
45	35	0,70
60	42	0,70
60	49	0,75
60	56	0,77
60	63	0,79
60	70	0,77
54	77	0,78
47	84	0,80
55	91	0,77
51	98	0,82
40	105	0,70
40	112	0,80

Tabla II
Valores de referencia del peso corporal (g) para ratas machos en función de la edad cronológica (días)

Edad (días)	L	M	S	P3	P10	P25	P50	P75	P90	P97
21	0,38	62,71	0,16	44,40	50,10	56,20	62,70	69,70	77,20	85,10
28	0,59	101,47	0,15	73,30	82,30	91,70	101,50	111,70	122,30	133,30
35	0,79	143,12	0,13	105,90	118,00	130,40	143,10	156,00	169,20	182,50
42	0,98	185,78	0,12	141,00	155,90	170,80	185,80	200,70	215,70	230,70
49	11,63	226,30	0,11	176,30	193,20	209,90	226,30	242,60	258,60	274,60
56	13,04	263,28	0,10	210,10	228,30	246,00	263,30	280,30	296,90	313,30
63	13,89	295,93	0,09	241,00	259,80	278,10	295,90	313,30	330,40	347,10
70	14,16	323,68	0,08	267,80	286,90	305,50	323,70	341,40	358,80	375,80
77	13,89	346,57	0,08	290,10	309,40	328,20	346,60	364,60	382,30	399,70
84	13,19	365,46	0,08	308,20	327,60	346,70	365,50	383,90	402,10	420,00
91	12,28	380,98	0,08	322,40	342,20	361,70	381,00	400,00	418,90	437,60
98	11,14	393,78	0,08	333,30	353,60	373,80	393,80	413,40	433,40	453,00
105	10,07	404,79	0,08	342,00	363,00	383,90	404,80	425,60	446,60	467,00
112	10,09	415,12	0,08	349,70	371,50	393,30	415,10	436,90	458,70	480,50

Tabla III
Valores de referencia del peso corporal (g) para ratas machos en función de la maduración somática (niveles)

Edad (días)	PVC (niveles)	L	M	S	P3	P10	P25	P50	P75	P90	P97
21,0	-2	-0,51	61,14	0,23	40,93	46,43	53,13	61,14	71,80	85,08	102,45
28,1	-1	-0,13	108,02	0,20	72,74	82,81	94,47	108,02	123,79	142,20	163,76
36,9	0	0,29	158,12	0,18	108,13	123,32	139,96	158,13	177,90	199,35	222,57
45,6	1	0,74	207,23	0,16	145,13	165,18	185,89	207,23	229,15	251,65	274,68
54,7	2	1,13	252,03	0,13	183,06	206,37	229,34	252,03	274,47	296,67	318,67
63,0	3	1,39	290,81	0,11	220,91	245,06	268,31	290,81	312,66	333,93	354,69
70,0	4	1,52	322,24	0,10	255,29	278,52	300,79	322,24	342,96	363,06	382,59
77,0	5	1,55	346,77	0,09	283,75	305,55	326,52	346,77	366,40	385,46	404,01
84,0	6	1,50	366,21	0,08	306,04	326,71	346,74	366,21	385,17	403,67	421,75
91,0	7	1,41	381,72	0,08	322,45	342,67	362,41	381,72	400,63	419,18	437,40
98,0	8	1,30	394,08	0,07	333,98	354,35	374,38	394,08	413,49	432,63	451,51
105,0	9	1,20	404,38	0,08	342,31	363,23	383,92	404,38	424,63	444,69	464,56
112,0	10	1,11	413,92	0,08	349,36	371,01	392,53	413,92	435,20	456,35	477,40

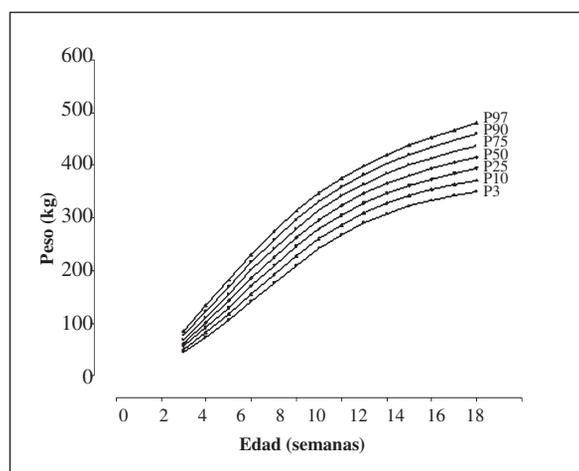


Fig. 1.—Curva de crecimiento de peso corporal (g) de ratas machos (Wistar) en función de la edad (semana).

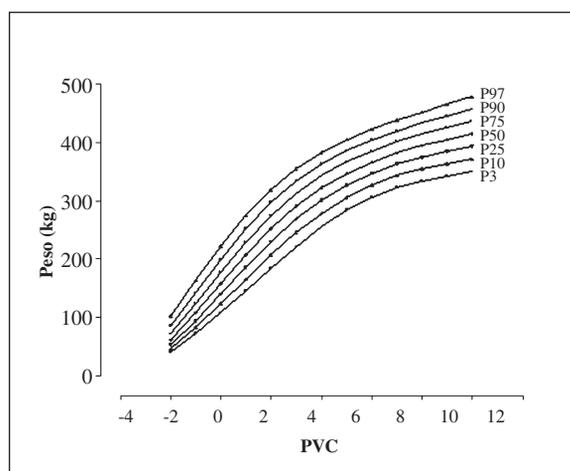


Fig. 2.—Curva de crecimiento de peso corporal (g) de ratas machos (Wistar) en función del PVC (niveles).

realizada de forma transversal en una muestra de 741 ratas machos. Esta variable, es un indicador del estado nutricional, puesto que proporciona una mejor idea de los efectos a corto plazo y de los cambios en los componentes corporales²².

Los resultados de las curvas en función del peso corporal (Tabla II) muestran que a los 21 días de edad, los roedores presentaron el 18,8% de su crecimiento, a los 56 días el 50% y a los 112 días el 100%, respectivamente. Este patrón de crecimiento observado en el estudio coincide por lo descrito por Enesco, Leblond¹ hace más de 50 años, en el que se distingue tres fases: la fase inicial denominada hiperplasia, que comprende los primeros 17 días de vida, la fase intermedia (hiperplasia-hipertrofia), que va desde los 17 hasta los 48 días de edad; y la fase final (almacenamiento), que comprende desde los 48 hasta los 160 días aproximadamente. En el caso de la última fase, los resultados del estudio apuntan hasta los 112 días y no hasta los 160 días. De hecho, es posible que factores extrínsecos como el de la tendencia secular probablemente puedan haber contribuido a la consecución de la edad adulta de forma más temprana. Aunque, según Hughes, Tanner²³ consideran que el crecimiento esquelético termina aproximadamente alrededor de los 120 días en ratas (machos y hembras) y el tiempo de vida de estos roedores oscila aproximadamente de 2 a 3,5 años⁶, respectivamente.

En relación a las curvas de crecimiento en función de la maduración somática (tabla III). Los resultados evidencian que el PVC (nivel 0) se observó a los 36,95 días. En esta edad se distingue un peso promedio de 158,12 g. Sin embargo, en la curva en función de la edad cronológica (tabla II) se observa a los 40 días de vida un peso superior (aproximadamente de 173,6 g). Esto lógicamente indica que el ritmo de crecimiento de los roedores en función de la edad cronológica y la maduración somática no son los mismos. Estos hallazgos indican que los patrones de crecimiento de ambas curvas varían desde los 21 hasta los 63 días aproximadamente (Tablas II y III). Luego, la distribución percentilar de ambas curvas son relativamente similares hasta los 112 días (nivel 10).

De hecho, estos hallazgos coinciden con lo reportado en la literatura, donde las ratas machos Wistar crecen a una velocidad máxima al menos los primeros 60 días²⁴ y 70 días²⁵. Además Freudenberg²⁶ resalta que la cepa Wistar alcanza la pubertad dentro de un rango de 36 a 66 días (específicamente a los 46,9 días), inclusive, otros estudios investigando la maduración somática indican que el PVC en la cepa de Wistar eutróficos se presentó a los 55 días²⁷ y a los 42 días¹⁹ y en cuanto a la maduración sexual, algunos estudios describen entre los 48-50 días aproximadamente^{25,28}. Desde esa perspectiva, nuestros resultados son consistentes, tanto con estudios que valoran la maduración somática y sexual, por lo que las ratas antes de los 42 días serían considerados como pre-púberes, y después de los 42 días hasta los 112 días como púberes. Por lo tanto, el periodo de la

adolescencia abarcaría al alrededor de 70 días aproximadamente.

Las curvas propuestas en función de la edad cronológica y la maduración somática son una posibilidad para valorar el crecimiento físico de ratas machos Wistar, dado que la condición nutricional depende directamente del consumo de dietas que contienen todos los factores de nutrición en cantidades apropiadas para cumplir los requisitos específicos de la persona en todas las etapas de la vida²⁹. En este sentido, en los roedores como ratas y ratones el peso es un índice fiable para valorar el sobrepeso y obesidad, puesto que se caracteriza por presentar exceso de grasa³⁰, aunque no valora de manera directa la composición corporal, pero en general, es un indicador de crecimiento somático y de valoración del estado nutricional no-invasivo. En este sentido, los bajos valores observados en el ETM (069-082), implican un adecuado control de calidad de las medidas. Esto permite reducir las mediciones del error al mínimo, por lo que según Goto, Mascie-Taylor³¹ es necesario para alcanzar una mayor precisión y reproducción de los resultados, sobre todo si se tratan de estandarizar los resultados.

En consecuencia, el método LMS utilizado en este estudio para desarrollar las curvas representa ciertas ventajas para la construcción de referencias de crecimiento. Según Kulaga y cols.³², los extremos de los centiles pueden ser estimados de forma más eficaz, cualquier centil puede ser calculado y cada observación puede ser convertida a su desviación estándar. Sin embargo, en el estudio no fue posible en control de algunas variables, como por ejemplo, la actividad metabólica, dado que desconocemos el gasto energético en reposo y en ejercicio. Esta información hubiera posibilitado una mejor caracterización del grupo estudiado, pero de cualquier forma, a menudo en los laboratorios, los roedores se encuentran normalmente confinados en jaulas, lo que impide una marcada actividad física. Por lo tanto, el gasto energético en reposo representa el 90% del gasto total diario y tan solo un 10% según algunos estudios representa la realización de actividad física diaria³³. Por otro lado, no se consideró la medición de la longitud total, a pesar de ser una variable relevante para el seguimiento del crecimiento longitudinal de los roedores³⁴ y es un predictor de la composición corporal³⁵. Sugerimos futuros estudios, en el que se utilicen otras medidas murinométricas y se desarrollen estudios longitudinales para controlar de mejor forma todo el ciclo de vida (desde el destete, hasta la muerte) de las ratas wistar.

Por lo tanto, se concluye que las curvas de crecimiento físico aquí propuestas sirven para realizar el seguimiento durante la fase de crecimiento, así como para diagnosticar y clasificar en grupos específicos en función del estado nutricional. Los resultados sugieren que los científicos de diversas áreas puedan usar tales referencias, con el objetivo de extrapolar las fases del crecimiento somático de la rata de laboratorio al modelo humano.

Referencias

1. Enesco M, Leblond P. Increase in cell number as factor in the growth of the organs and tissues of the young male rat. *J Embryol Exp Morph* 1962; 10 (4): 530-62.
2. Layman DK, Hegarty PVJ, Swan PB. Comparison of morphological and biochemical parameters of growth in rat skeletal muscles. *J Anat* 1980; 130 (1): 159-71.
3. Lasker, G. W. The place of anthropometry in human biology. In Ulijaszek SJ & Mascie –Taylor CGN (Eds.) *Anthropometry: the Individual and the Population*. Cambridge: Cambridge University Press, 1994. pp. 1-6.
4. De Onis M. Growth curves for school-age children and adolescents. *Ind Pediatr* 2009; 46: 463-5.
5. Quinn DVM. Comparing rats to human's age: How old is my rat in people years. *Nutrition* 2005; 21 (6): 775-7.
6. Sengupta P. A Scientific Review of Age Determination for a Laboratory Rat: How Old is it in Comparison with Human Age? *Biomed Int* 2011; 2: 81-89. ©2011 Biomedicine International, Inc.
7. Harari D, Hermolin G, Harari O. The effect of age on morphology and eruption of the lower incisors in mature rats. *Arch Oral Biol* 2005; 50 (11): 953-8.
8. Olza Meneses J, Porres Foulquie J, Urbano Valero G, Martínez de Victoria E, Gil Hernández A. Evaluación biológica de la calidad de una mezcla de proteínas para uso en nutrición enteral. *Nutr Hosp* 2008; 23 (3): 206-11.
9. García Coret MJ, Villalba Ferrer F, Vázquez Prado A, Fuster Diana C, Ramos de Campos M, Morena Valenzuela E, Trullenque Peris R. Estudio experimental sobre la influencia inmunomoduladora de la pentoxifilina en la translocación bacteriana producida por la nutrición parenteral sin lípidos. *Nutr Hosp* 2002; XVII (5): 223-30.
10. Diemen D, Trindade E, Trindade M. Experimental model to induce obesity in rats. *Acta Cir Bras* 2006; 21 (6): 425-9.
11. Llinás MT, González JD, Moreno C, Salazar FJ. Modelos animales experimentales. En: Rodríguez Martínez J, Hernández Lorente MD, Costa Ruiz J. (Editores). *Introducción a la experimentación con animales*. 1ª edición. Universidad de Murcia, 2001. pp. 85-94.
12. Gebczynska Z. Morphological changes occurring in laboratory *Microtus agrestis* with age. *Acta Theriol* 1964; 9: 67-79.
13. Fuller W. Is weight a reliable index to age in microtine rodents? *Acta Theriol* 1988; 33: 247-61.
14. Broekhuizen S, Maaskamp F. Age determination in the European hare (*Lepus europeus*, Pallas) in The Netherlands. *Z. Säugetierkd* 1979; 44: 162-75.
15. Prieto Fernández JG, Álvarez de Felipe AL. Fisiología comparada de los animales de experimentación. En: Pérez García CC, Díez Prieto MI, García Partida P (eds). *Introducción a la experimentación y protección animal*. León, Universidad de León, 1999: 91-102.
16. Pankakoski E. An improved method for age determination in the muskrat, *Ondatra zibethica*. *Ann Zool Fennici* 1980; 17: 113-21.
17. Cossio MA, Gómez R, Arruda M, Hochmuller R. Valores de confiabilidad de indicadores somáticos en ratas machos wistar. *Actualización en Nutrición* 2010; 11 (4): 296-302.
18. Cano-Rabano M, Rios-Granja M. Cuidado y mantenimiento de los animales de experimentación. In: Perez-García C, Díez-Prieto M, García-Partida, P. *Introducción a la Experimentación y Protección Animal*. Ed. Universidad de León, España 1999, 91-102.
19. Cossio-Bolanos MA, Gómez-Campos R, Pilco-Quesada S, Lancho-Alonso JL, Arruda M. Propuesta de una ecuación lineal para valorar la velocidad de crecimiento somático a partir de la masa corporal de ratas machos Wistar. *An Fac Med* 2012; 73 (2): 93-100.
20. Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, Dietz WH. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ* 2000; 320: 1240-3.
21. Pan H, Cole TJ. LMS Chartmaker. 2006. <http://www.healthforallchildren.co.uk>, ccessed 11 march 2012.
22. López Blanco M, Landaeta M. Manual de Crecimiento y Desarrollo. Sociedad Venezolana de Puericultura y Pediatría. Evaluación Nutricional Antropométrica Fundacredesa. Capítulo III, 1991.
23. Hughes PCR, Tanner JM. The assessment of skeletal maturity in the growing rat. *J Anat* 1970; 106 (2): 371-402.
24. Dixon AD, Styrk PJ. Growth changes in the craniofacial complex of the rat after prolonged papa in administration. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 1994; 105: 270-8.
25. Meisami E. Complete recovery of growth deficits after reversal of PTU-induced postnatal hypothyroidism in the female rat: a model for catch-up growth. *Life Sci* 1984; 34: 1487-96.
26. Freudenberger CB. A Comparison of the Wistar Albino and the Long-Evans Hybrid Strain of the Norway rat. *Am J Ana* 1932; 50: 293-349.
27. Willians JPG, Tanner JM, Hughes PCR. Catch-up growth in male rats after growth retardation during the suckling period. *Pediat Res* 1974; 8 (3): 149-56.
28. Lee, VWK, De Kretser DM, Hudson B, Wang C. Variations in serum FSH, LH and testosterone levels in male rats from birth to sexual maturity. *J Reprod Fert* 1975; 42 (1): 121-6.
29. Oslon RE. Evolución de la investigación en nutrición. In: OPS. *Conocimientos actuales sobre nutrición*. 6. ed. Washington, 1991. pp. 582-6.
30. Furnes MW, Zhao CM, Stenstrom B, Arum CJ, Tommeras K, Kulseng B, Chen D. Feeding behavior and body weight development: lessons from rats subjected to gastric bypass surgery or high-fat diet. *Journal of Physiology and Pharmacology* 2009; 60 (7): 25-31.
31. Goto R, Mascie-Taylor NCG. Precision of measurement as a component of human variation. *J Physiol Anthropol* 2007; 26: 253-6.
32. Kułaga Z, Litwin M, Tkaczyk M, Palczewska I, Zajączkowska M, Zwolinska D, Krynicki T, Wasilewska A, Moczulska A, Morawiec-Knysak A, Barwicka K, Grajda A, Gurskowska B, Napieralska E, Pan H. Polish 2010 growth references for school-aged children and adolescents. *Eur J Pediatr* 2011; 170: 599-609.
33. Miyasaka K, Ichikawa M, Kawanami T et al. Physical activity prevented age-related decline in energy metabolism in genetically obese and diabetic rats, but not in control rats. *Mech Ageing Dev* 2003; 124: 183-90.
34. Stewart JC, Preece P, Sheppard HG. The long-term effects of marginal protein energy deficiency. *Proc Nutr Soc* 1975; 32 (3): 102-3.
35. Gómez Campos, R. Arruda M. Cossio-Bolaños MA. Validez de ecuaciones somáticas para predecir la composición corporal de ratas machos wistar. *Actualización en nutrición* 2011; 12 (1): 60-6.