

TAMY INGRID RESTEL

**AVALIAÇÃO PONDERAL, HEMATÓLOGICA E BIOQUÍMICA EM
CAMUNDONGOS *Mus musculus*, LINHAGEM SWISS, MACHOS E
FÊMEAS DE DIFERENTES IDADES, DO BIOTÉRIO CENTRAL DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GRSSO DO SUL, CAMPO
GRANDE, MS**

CAMPO GRANDE
2012

TAMY INGRID RESTEL

**AVALIAÇÃO PONDERAL, HEMATÓLOGICA E BIOQUÍMICA EM
CAMUNDONGOS *Mus musculus*, LINHAGEM SWISS, MACHOS E
FÊMEAS DE DIFERENTES IDADES, DO BIOTÉRIO CENTRAL DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL, CAMPO
GRANDE, MS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Áreas de Concentração: Tecnologia e Saúde

Linha de Pesquisa: Modelos Animais de Doença

Orientadora: Profa. Dra. Iandara Schettert da Silva

Campo Grande/MS
2012

FOLHA DE APROVAÇÃO

TAMY INGRID RESTEL

**AVALIAÇÃO PONDERAL, HEMATÓLOGICA E BIOQUÍMICA EM
CAMUNDONGOS *Mus musculus*, LINHAGEM SWISS, MACHOS E
FÊMEAS DE DIFERENTES IDADES, DO BIOTÉRIO CENTRAL DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL, CAMPO
GRANDE, MS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Resultado _____

Campo Grande (MS), _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Iandara Schettert Silva

Instituição UFMS.

Profa. Dra. Mônica Cristina Toffoli Kadri

Instituição UFMS.

Profa. Dra. Lenir Cardoso Porfirio

Instituição UFES.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha **mãe**, Maria Elizabeth Restel, *in memoriam*, por ter me concebido, com a graça de Deus, sem Ele, eu não estaria aqui.

A minha **filha** Bárbara Restel Berté, por existir e ser a razão de minha existência, meu grande amor.

A meu tesouro Edmar Ferreira de Oliveira, meu **marido**, que mesmo aos cinquenta ponto zero, fez-me conhecer e acreditar neste sentimento sublime que é o amor no casamento, fazendo-me feliz cada dia mais. Obrigada, meu amor eterno.

Simplesmente, a **mim**, por ter aproveitado as oportunidades e alcançado a pessoa que gostaria de ser.

AGRADECIMENTOS

A meu pai, **Milton Restel**, pela simplicidade de sua vida, por ser exemplo para todos nós e pelo seu vasto conhecimento.

As minhas irmãs, **Lúcia Teresinha Restel Silva** e **Dominique José Restel Medina**, e meu irmão, **Christiano José Restel**, por terem se tornado mulheres corajosas, e homem de bem.

Aos meus **cunhados e cunhada**, por serem companheiros, estarem sempre juntos, estimulantes, brincalhões e me darem a certeza de que serão avós e avôs maravilhosos.

A minha Orientadora Professora Doutora **Iandara Schettert Silva**, por ter plantado a grande idéia, acreditado na importância deste trabalho, estimulado a realizá-lo e acompanhado durante toda a trajetória, meu eterno agradecimento.

A minha amiga de ontem, hoje e sempre, **Lenir Cardoso Porfirio**, por suportar os choros, resmungos, recomeços, o meu muito obrigado.

À amiga, mais do que irmã, **Telma Bazzano** pela energia, pela força, por sempre estar me estimulando, por ser meu exemplo, obrigada.

À **Rosalina Aparecida Ferreira de Rezende (Tuka)**, minha cunhada, pelos churrascos maravilhosos, pela cerveja gelada nos momentos de merecido descanso, obrigada.

Aos **colegas do Biotério**, Peterson, Edson, Peterson (Mirim) e dona Rosária, pelos muitos cafezinhos, pela ajuda, estímulo e por nunca terem me deixado na mão, nos momentos em que precisei me ausentar.

À **Elane Fabrício de Jesus**, médica veterinária, sem a qual não teria conseguido aprender a técnica de coleta em animais tão pequenos e indefesos.

À **Adriana Conceição Guércio** por ajudar nas coletas de sangue, meu muito obrigada.

Ao **Laboratório de Bioquímica do Núcleo do Hospital Universitário** e a **Paulo César Lourenzo** por terem possibilitado a realização das análises bioquímicas séricas, muito obrigada pelo apoio dispensado.

Ao **Laboratório de Hematologia do Núcleo do Hospital Universitário**, pelo auxílio e cooperação no manuseio dos equipamentos e realização das análises hematológicas, obrigada à **Mara Lúcia Bellinate** pela ajuda.

À sala de captura de imagens do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, à equipe do núcleo de fotografia, em especial à **Priscila Soares dos Santos**.

À **Nádia Scheeren**, meus agradecimentos sinceros, pela correção e formatação deste trabalho.

À **Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)**, pela possibilidade que proporcionou o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

À Professora Doutora **Edna Scremin Dias**, diretora do CCBS e chefe ímpar, por sempre estimular, apoiar e liberar de algumas responsabilidades para a concretização de mais um sonho.

À **Vera Nascimento Silva**, secretária do Programa de Pós-Graduação carinhosamente tratada como Verinha, com carinho agradeço.

Ao amigo **Marcelo Carretoni** por ajudar na finalização deste trabalho, obrigada.

A todos os **professores do Programa de Pós-Graduação**, agradeço o conhecimento, a técnica, a postura e a ética com que me ensinaram.

Ao Professor Doutor **Ricardo Dutra Aydos**, Coordenador da Pós-Graduação, por ter sido o ponto inicial de todo esse Programa, por sua competência e persistência.

Ao Professor Doutor **Albert Schiaveto de Souza**, pela paciência e presteza em realizar as análises estatísticas deste trabalho, meu super obrigada.

E claro, espero que não tenha esquecido ninguém, mas não posso deixar de agradecer aqueles que sem eles, este trabalho não teria sentido, **camundongos *Mus musculus***, linhagem SWISS, meu sincero respeito e reconhecimento pela sua importância para a Ciência.

Além do horizonte existe um mundo inexplorado pelo ser humano, cujos
segredos pretendo descobrir...

(Tamy Ingrid Restel de Oliveira, 2012)

RESUMO

Restei TI. AVALIAÇÃO PONDERAL, HEMATÓLOGICA E BIOQUÍMICA EM CAMUNDONGOS *Mus musculus*, LINHAGEM SWISS, MACHOS E FÊMEAS DE DIFERENTES IDADES, DO BIOTÉRIO CENTRAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GRSSO DO SUL, CAMPO GRANDE, MS

Campo Grande; 2012. [Dissertação – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

Uma normatização de parâmetros e de intervalos de referência próprios de cada biotério é necessária, pois refletem a condição da população em que os testes serão aplicados cotidianamente. O objetivo deste trabalho foi descrever os valores de referência para os parâmetros hematológicos e bioquímicos de camundongos (*Mus musculus*) da linhagem SWISS. Foram utilizados 14 camundongos, machos e fêmeas. Após anestesia se fez punção cardíaca para obtenção de sangue para hemograma e bioquímica sérica aos 30, 45, 60, 75, 90, 105 e 120 dias, após o nascimento. Analisando os parâmetros hematológicos, no leucograma observou-se que, à medida que aumenta a idade, diminui os neutrófilos e aumentam os linfócitos ($79,86 \pm 4,61\%$ a $91,54 \pm 2,91\%$), em fêmeas e nos machos de ($78,09 \pm 4,37$ a $84,24 \pm 5,35\%$), permanecendo após os 105 dias, os respectivos valores em ambos os gêneros. Os monócitos estiveram maiores em animais de 30 dias de vida. Os eosinófilos aumentaram com a idade e raros basófilos. No eritrograma, todos os parâmetros mantiveram-se semelhantes, com exceção da largura da distribuição de hemácias relacionada ao desvio padrão e o volume corpuscular médio, que aos 30 dias foram maiores, indicando regeneração e células de maior tamanho, mas sem anemia. Quanto aos analitos séricos, a atividade da alanina amino transferase, proteína sérica, albumina, globulina, relação albumina: globulina, creatinina, triglicérides e lipídios de muito baixa densidade, permaneceram dentro dos mesmos intervalos, independente do peso e da idade. O colesterol foi o analito que mais variou dentro das faixas etárias consideradas. Conclui-se que as diferenças ocorridas no sangue e soro são em consequência da evolução etária dos animais, e ocorreram como fator fisiológico normal.

Palavras-chave: leucograma, eritrograma, analitos séricos.

ABSTRACT

Restel IT. EVALUATION PONDERAL, hematological and biochemical IN MICE *Mus musculus*, Lineage SWISS, MALES AND FEMALES OF DIFFERENT AGES, the animal colony of FEDERAL UNIVERSITY OF SOUTH MATO GRSSO, CAMPO GRANDE, MS [Dissertation - Federal University of Mato Grosso do Sul].

A standardization of parameters and reference intervals specific to each vivarium is required; it reflects the conditions of the population in which the tests are applied daily. The aim of this study was to describe the reference values for hematological and biochemical parameters of mice (*Mus musculus*) Swiss strain. Were used 14 mice, males and females. After anesthesia became cardiac puncture to obtain blood for blood count and serum biochemistry at 30, 45, 60, 75, 90, 105 and 120 days after birth. Analyzing the hematological parameters, the leukocyte count was observed that, as the age increases, decreases neutrophils, lymphocytes and increased ($79.86 \pm 4.61\%$ and $91.54 \pm 2.91\%$) in females and in males (78.09 ± 4.37 to $84.24 \pm 5.35\%$), remaining after the 105 days, the respective values in both sexes. Monocytes were higher in animals 30 days of life. Eosinophils increased with age and rare basophiles. In erythrogram, all parameters remained similar, except for the width of the distribution of red blood cells related to the standard deviation and the mean corpuscular volume, which at 30 days were higher, indicating regeneration of cells and larger, but without anemia. As for serum analytes, the activity of alanine amino transferase, serum protein, Albumin, globulin, Albumin: globulin, creatinine, triglycerides and very low density lipids remained within the same intervals, regardless of weight and age. Cholesterol was the analyte most varied within the age groups considered. It is concluded that the differences in blood and serum are due to changes in age of the animals, and occurred as normal physiological factor.

Keywords: WBC, red blood cell count, serum analytes,

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Valores médios e desvio padrão do peso de camundongos jovens e adultos, machos e fêmeas da linhagem SWISS, antes de cada procedimento.....	36
Tabela 2	– Valores médios e desvio padrão obtidos no leucograma de camundongos jovens e adultos, machos e fêmeas da linhagem SWISS	40
Tabela 3	– Valores médios e desvio padrão obtidos no eritrograma e do número de plaquetas de camundongos jovens e adultos, machos e fêmeas da linhagem SWISS.....	47
Tabela 4	– Valores médios e desvio padrão obtidos na bioquímica sérica de camundongos jovens e adultos, machos e fêmeas da linhagem SWISS	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Camundongos da linhagem SWISS, em caixa de polipropileno com maravalha	29
Figura 2	– Estantes ventiladas, alocadas no Setor de Experimentação do Biotério Central-UT/CCBS/UFMS	30
Figura 3	– Camundongo sendo contido para receber anestésico	30
Figura 4	– Camundongo recebendo anestésico por via intramuscular	31
Figura 5	– Obtenção de amostra de sangue, por via intracardíaca	31
Figura 6	– Amostra de sangue em frasco com anticoagulante	32
Figura 7	– Amostra de sangue em frasco sem anticoagulante	32
Figura 8	– Aparelho automatizado para exames hematológicos da marca Sysmex XE 2100 do Laboratório do NHU / UFMS	33
Figura 9	– Equipamento para captura de imagens da marca Leica DM, 5.500 B do Laboratório de Captura de Imagens do CCBS/ UFMS	34
Figura 10	– Aparelho automatizado para Análises Bioquímicas da marca Cobas Integras 400 do NHU/ UFMS	35
Figura 11	– Neutrófilos segmentados nos esfregaços sanguíneos de camundongos macho (a) e fêmea (b), da linhagem SWISS. Corado com Panótico. Objetiva de imersão	39
Figura 12	– Linfócitos nos esfregaços sanguíneos de camundongos macho (a) e fêmea (b), da linhagem SWISS. Corado com Panótico. Objetiva de imersão	42
Figura 13	– Monócitos nos esfregaços sanguíneos de camundongos macho (a) e fêmea (b), da linhagem SWISS. Corado com Panótico. Objetiva de imersão	43
Figura 14	– Eosinófilos nos esfregaços sanguíneos de camundongos macho (a) e fêmea (b), da linhagem SWISS. Corado com Panótico.	

Objetiva de imersão	44
Figura 15 – Plaquetas nos esfregaços sanguíneos de camundongos macho (a) e fêmea (b), da linhagem SWISS. Corado com Panótico.	
Objetiva de imersão	51
Figura 16 – Policromasia nos esfregaços sanguíneos de camundongos jovem (a) e adulto (b), da linhagem SWISS. Corado com Panótico.	
Objetiva de imersão	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A:G	Relação Albumina: globulina
Alb..	Albumina
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
BAlb./c	Linhagem isogênica de camundongos
Bas.	Basófilos
Bast.	Bastões, bastonetes
C57BL/6	Linhagem isogênica de camundongos
CCBS	Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
Col.	Colesterol
Crea	Creatinina
CrI:CD-1 (ICR)BR	Linhagem SWISS
EDTA	Etilenodiaminotetracético.
Eos.	Eosinófilos
Glob.	Globulina
Hb	Hemoglobina
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
Hm	Hemácias, eritrócitos, glóbulos vermelhos
Ht	Hematócrito
IC	Intracardíaca
Leuc.	Leucócitos totais, glóbulos brancos
Linf.	Linfócitos
MC	Sangue oriundo da veia cava mais o sangue coletado da cavidade do peritônio
Mon.	Monócitos
VMP	Volume médio de plaquetas
<i>Mus musculus</i>	Nome científico de camundongos de laboratório
Neut.	Neutrófilos

Plaq.	Plaquetas
<i>Pool</i>	Mistura de vários pequenos volumes
Pós-teste de Tukey	Teste estatístico
PPT	Proteína plasmática, proteína total
Ps	Proteína sérica
RDW	Largura da distribuição de hemácias
RDW-CV	Largura da distribuição de hemácias relacionada ao volume corpuscular
RDW-SD	Largura da distribuição de hemácias relacionada ao desvio padrão
Rel.	Relação
Ret.	Reticulócitos
RO	Retro-orbitário, retro-orbital, plexo venoso retro-orbitário
SWISS	Linhagem heterogênea, de camundongos
Teste ANOVA	Teste estatístico
Trig.	Triglicerídeos
UFMS	Universidade Federal do Mato Grosso do Sul
VC	Veia cava caudal
VCM	Volume Corpuscular Médio
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Camundongos da linhagem SWISS, na Experimentação	19
2.2 Avaliação ponderal da linhagem Swiss, em experimentação	20
2.3 Abordagens metodológicas para obtenção de amostras sanguíneas em animais de experimentação	21
2.4 Parâmetros hematológicos: leucócitos, hemácias e plaquetas	23
2.5 Parâmetros bioquímicos séricos	26
3 OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo geral	28
3.2 Objetivos específicos	28
4 MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 Seleção dos animais e manutenção	29
4.2 Procedimentos para coleta de sangue	31
4.3 Parâmetros hematológicos: leucócitos, hemácias e plaquetas	33
4.4 Parâmetros bioquímicos séricos	35
4.5 Eutanásia	36
4.6 Análise estatística	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 Parâmetros para o peso dos animais	37
5.2 Parâmetros relacionados à técnica de coleta de sangue	38
5.3 Parâmetros Hematológicos Leucocitários	39
5.3.1 Leucócitos	39
5.3.2 Neutrófilos	40
5.3.3 Linfócitos	41
5.3.4 Monócitos	42
5.3.5 Eosinófilos	43
5.3.6 Basófilos	44
5.4 Parâmetros Hematológicos Eritrocitários e Plaquetas	45

5.4.1 Eritrócitos	45
5.4.2 Hemoglobina	48
5.4.3 Hematócrito	48
5.4.4 Volume Corpuscular Médio (VCM)	49
5.4.5 Hemoglobina Corpuscular Média (HCM)	50
5.4.6 Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM)	50
5.4.7 Plaquetas	51
5.4.8 Largura da Distribuição de Hemácias relacionada ao desvio padrão (RDW-SD)	52
5.4.9 Largura da Distribuição de Hemácias Relacionada ao Volume Corpuscular (RDW-CV)	52
5.4.10 Volume Médio de Plaquetas (VMP)	53
5.5 Parâmetros Bioquímicos Séricos	54
5.5.1 Albumina	56
5.5.2 Globulina	56
5.5.3 Relação Albumina:Globulina	57
5.5.4 Proteínas Totais	57
5.5.5 Alanina Aminotransferase (ALT)	58
5.5.6 Colesterol	59
5.5.7 Creatinina	59
5.5.8 Triglicérides	60
5.5.9 Lipoproteína de Muito Baixa Densidade (VLDL)	62
6 CONCLUSÕES	59
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
8 REFERÊNCIAS	64
ANEXO 1	70
ANEXO 2	71
ANEXO 3	72

1 INTRODUÇÃO

O uso de animais com objetivos científicos é uma prática comum e constitui ferramenta para os avanços na compreensão da vida, na prevenção e no tratamento de doenças, uma vez que ainda não existem sistemas alternativos disponíveis que permitam a substituição completa desses animais (MAJEROWICZ, 2008). Para que essa prática seja moralmente aceitável e apresente resultados confiáveis, é fundamental ter-se a consciência de que o animal, como qualquer ser vivo, possui hábitos de vida próprios da sua espécie, apresenta memória, preserva o instinto de sobrevivência e é sensível à angústia e à dor. Por essas razões, preconizam-se posturas éticas em todos os momentos do desenvolvimento dos estudos com animais de experimentação (PAIVA; MAFFILI; SANTOS, 2005).

Dessa forma, é fundamental que os projetos para utilização de animais sejam bem planejados, que utilizem técnicas sensíveis para detecção de diferenças biológicas e, dessa forma, permitam a avaliação de fenômenos biológicos naturais, induzidos ou comportamentais e, a comparação aos fenômenos humanos em estudo. Conseqüentemente obter-se-ão resultados com alto grau de acuidade, alto nível de reprodutibilidade e precisão, garantindo o sucesso da pesquisa (DAMY *et al.*, 2010).

Os animais de laboratório foram utilizados por muito tempo, como simples “instrumentos de trabalho”, colaborando na investigação do diagnóstico de diferentes pesquisas, sem levar em consideração sua condição sanitária e genética (FERREIRA *et al.*, 2005).

Quando animais são submetidos ao estresse ou a condições que promovam modificação da sua fisiologia, com resposta adaptativa, podem ocorrer mudanças durante a experimentação. Essas alterações nos valores de normalidade nos parâmetros hematológicos, químicos e até morfológicos, direcionam ao local onde possam estar ocorrendo as lesões no organismo desses animais, e supostamente, pode-se extrapolar para outros mamíferos, principalmente os animais domésticos e os de produção (ANDERSEN; SOUZA, 2009). As regras confiáveis para validar a extrapolação de uma espécie para outra devem ser avaliadas em cada experimento e podem ser verificadas, após os primeiros estudos na espécie alvo (FAGUNDES; TAHA, 2004). O uso de dados na literatura deve considerar a variação em relação à

espécie, métodos de coleta de amostra, manipulação e análise nos valores de referência (SCHNECK *et al.*, 2000).

O conhecimento dos valores dos diferentes parâmetros fisiológicos é critério importante para a avaliação da homeostase, das modificações induzidas por processos patológicos e dos resultados obtidos nos procedimentos experimentais (ALMEIDA *et al.*, 2008). A determinação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos em valores considerados normais em uma população de espécimes mantidas em cativeiro é uma ferramenta de diagnóstico essencial para estimar suas condições de saúde e diagnosticar doenças, mesmo antes do aparecimento dos sintomas (TROIANO; GOULD; GOULD, 2008).

O camundongo é o modelo experimental mais amplamente utilizado e compreendido pelos cientistas para testes laboratoriais com propósito de ensino e pesquisa biomédica (ANDERSEN *et al.*, 2004).

Diferentes linhagens de camundongos são utilizadas em pesquisas científicas, a exemplo da linhagem SWISS (SPINELLI *et al.*, 2012). Camundongos da linhagem C57BL/6, machos adultos e fêmeas jovens, são significativamente diferentes em alguns parâmetros imunológicos. Kajioka *et al.* (2000) citam que animais de diferentes fontes comerciais podem variar ainda mais esses valores. Spinelli *et al.*, (2012) por sua vez, acrescenta que os animais de laboratório criados em diferentes biotérios apresentam variações em seus valores, nos parâmetros bioquímicos em razão da dieta, manejo, estado sanitário, idade e vias de coleta de sangue.

No presente trabalho, foram utilizados camundongos (*Mus musculus*), da linhagem SWISS, machos e fêmeas em diferentes idades, com o propósito de avaliação ponderal, hematológica e bioquímica destes animais. As análises das amostras foram realizadas seguindo os valores padronizados no Brasil e no exterior, buscando contribuir para a obtenção de valores de referência dessa espécie no Biotério Central, Unidade Técnica do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (CCBS/ UFMS), Campo Grande/MS e, para a utilização desses dados pelos pesquisadores que farão uso dessa espécie em condições experimentais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Camundongos da linhagem SWISS, na Experimentação

Os camundongos da espécie *Mus musculus*, ordem Rodentia, família Muridae e linhagem *Swiss*, tiveram origem nos Estados Unidos da América a partir de uma colônia de nove camundongos trazidos para Lausanne, Suíça, em 1926 por Clara Lynch. São poligâmicos com duração do estro, de 4-5 dias e gestação de 19 a 20 dias com prole variando entre 10 e 12 filhotes com aproximadamente 1.5g de peso cada animal. Apresentam pelagem branca e possuem extensas variações alélicas estimados em 46 locus genéticos, dentro das três principais colônias *Swiss* de linhagens consangüíneas ou derivativas. São modelos com propósitos para estudos dos mais variados, como doenças metabólicas, autoimunes, fixação de complemento, tumores de mama e pulmão, teste de drogas, estudo de comportamento e são úteis como receptora de embriões de linhagens não albinas Machado *et al.*, (2012), e também em diversos modelos experimentais, para avaliação da atividade farmacológica de extratos vegetais e de formas farmacêuticas (CHORILLI; MICHELIN, 2007)

Os pesquisadores exigem que estes animais reúnam condições ideais, e que sejam mantidos em ambiente controlado para que atendam os parâmetros de qualidade sanitária e genética, uma vez que são “reagentes biológicos”, e os resultados dos experimentos podem ser afetados em razão das condições de cada espécie utilizada (FERREIRA, HOCHMAN, BARBOSA, 2005).

Em estudos comparativos com animais experimentais, as diferenças na fisiologia, no genótipo, fenótipo e na maturidade em um determinado peso e idade devem ser considerados. Os animais devem ser da mesma origem durante todo ensaio, pois mesmo animais isogênicos podem diferir de um biotério para outro (DAMY *et al.*, 2010).

Desde então, a busca do entendimento de fatores etiológicos, mecanismos e tratamento das doenças têm levado ao desenvolvimento de vários modelos animais nas últimas décadas. Assim, os modelos animais passaram a ser empregados em

todas as áreas da pesquisa biológica (MONTEIRO, BRANDAU, GOMES, BRAILE, 2009)

2.2 Avaliação ponderal da linhagem Swiss, em experimentação

Experimentos farmacológicos e toxicológicos demonstram diferentes pesos de camundongos da linhagem SWISS, utilizados como grupo controle. Camundongos da linhagem Swiss, fêmeas, 6-7 semanas de idade, peso médio de 30g, procedentes de biotério, Silva (2007) promoveu a avaliação ponderal pelo controle de peso semanal com o auxílio de uma balança de precisão. A adição dietética de milho *quality protein maize* BR473 reduziu o consumo alimentar e o tecido adiposo retroperitoneal, porém manteve a glicemia e trigliceridemia em relação à adição de milho híbrido na ração comercial. A avaliação foi obtida pela diferença entre o peso atingido aos três meses após o início da dieta e o peso inicial, alimentando os animais com diferentes dietas.

Camundongos *Swiss Webster*, machos, foram desmamados precocemente (14^o dia de vida) ou amamentados até o 21^o dia de vida (grupo controle), e concluiu que o peso corporal dos animais do grupo desmamado de forma precoce foi significativamente maior no 28^o, 35^o e no 63^o dias de vida em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Porém, o consumo de ração não diferiu entre os grupos. O desmame precoce, associado à ingestão de ração elaborada para roedores em crescimento, resultou em aumento do ganho de peso, porém não afetou a composição corporal de camundongos adultos (ROGERO *et al.*, 2010).

Camundongos Swiss machos de 3 meses e peso médio de 28g foram utilizados para avaliar a toxicidade aguda do extrato hidroalcolólico de *Melipona fasciculata* e proveniente da baixada maranhense, Reis *et al.*, (2008) concluíram que apesar de não causar mortes nem alterar o peso corpóreo, o extrato modifica parâmetros hematológicos e consumo de água, não indicando, necessariamente, que sejam efeitos tóxicos.

Barcelos *et al.*, (2010) utilizaram camundongos da linhagem Swiss, de ambos os gêneros, com idade de 3 meses. No tratamento agudo os animais receberam, por via oral, diferentes doses do extrato aquoso de *E. oleracea* nas doses de 100, 500 e 1000mg/kg. Durante 14 dias foram avaliados o peso corpóreo, comportamento, atividade somática e alterações macroscópicas. Nos resultados não foram ob-

servadas variação de peso dos animais ou alterações macroscópicas após tratamento

Reis *et al.* (2000), utilizaram camundongos machos dessa linhagem, pesando entre 20 e 25 gramas e obtiveram parâmetros fisiológicos dos animais controle para hematologia, em pesquisa da atividade anti-inflamatória, antiúlcera gástrica e toxicidade subcrônica do extrato etanólico de própolis em roedores. Verçosa Júnior *et al.* (2004) em trabalho de administração de *Agaricus blazei* (cogumelo do sol) nas formas de filtrado e suspensão total aquosa em camundongos portadores de tumor de Ehrlich sólido, utilizaram fêmeas adultas, com peso entre 25 e 30 gramas.

Xavier (2011) avaliando a atividade antitumoral e toxicidade do óleo essencial das folhas de *Lippia microphylla* por meio do ensaio *in vivo*, utilizou camundongos com 60 dias com peso entre 28 a 32 gramas. Melo *et al.* (2008) cita no seu ensaio toxicológico de administração de frações de *Mascagnia rígida*, a utilização de fêmeas SWISS, de mesma idade e peso entre 25 a 30g. Em estudos para determinação da DL₅₀ (dose letal 50%) do extrato de Própolis Vermelha padronizado, Rodrigues (2010) utilizou machos de 20 a 30 gramas.

Experimentos relacionados à infecção experimental também citam diferentes pesos de camundongos SWISS. Silva (2009) em trabalho de infecção experimental com *Trypanosoma cruzi* utilizou machos, com peso entre 18 e 20 gramas. Guimarães, Pinto e Melo (2011) em estudo com veneno escorpiônico, detalharam o perfil clínico e os valores hematológicos de machos, com peso médio de 30 gramas. Souza (2003) utilizou ambos os gêneros, entre 40 e 70 dias de idade pesando de 25 a 30 gramas, em pesquisa sobre produtos com efeito anti-helmíntico de *Annona squamosa*, como fitoterápico, sobre nematóides gastrintestinais de ovinos e caprinos.

2.3 Abordagens metodológicas para obtenção de amostras sanguíneas em animais de experimentação

A coleta de sangue de camundongos é necessária para uma variedade de estudos científicos e há uma grande diversidade de métodos disponíveis. A escolha correta do local em que o sangue será coletado, bem como a técnica empregada para tal fim, é de extrema importância (CHORILLI; MICHELIN, 2007).

Segundo Hoff (2000) há uma série de fatores que devem ser considerados, com o objetivo de se obter dados mais confiáveis e, estressar de maneira menos intensa os animais empregados nos estudos. São eles: a escolha da técnica e do local de coleta de sangue, a frequência da coleta, o uso de anestésicos, efeito nos parâmetros sanguíneos, volume requerido, dentre outros.

A técnica utilizada para obter amostra sanguínea afeta os valores dos parâmetros usados para avaliar a saúde animal. Nas pesquisas de Fernández *et al.* (2010) foram encontradas diferenças significativas para oito dos nove parâmetros bioquímicos estudados entre duas técnicas de amostragem de sangue de camundongo C57BL/6J. Em comparação com amostras coletadas do plexo retro-orbitário, o sangue retirado da veia submandibular tinha níveis mais elevados de Alanina aminotransferase (ALT), Aspartato aminotransferase (AST), Albumina (Alb.) Proteína total (PPT), Triglicérides (Trig.), Colesterol (Col.) e de Creatinina (Crea). Acrescentam que se deve tomar cuidado ao comparar os resultados das análises bioquímicas de sangue obtido a partir da veia submandibular em camundongos C57BL/6J, com valores de referência obtidos por outras técnicas de amostragem de sangue.

Fernández *et al.* (2010), consideraram fácil realizar a coleta de sangue pelo plexo retro-orbital e sugeriram o método para procedimento terminal. Souza (2003) também realizou coletas de sangue pelo plexo retro-orbital para contagem total de leucócitos, hematócrito e avaliação dos níveis de uréia, creatinina, AST e ALT, obtendo cerca de 300 µL de sangue.

Utilizando diferentes gêneros e técnicas de coleta dentro do mesmo estudo, Doeing, Borowicz e Crockett (2003), relataram que o sangue pode ser coletado a partir da punção da veia caudal. Caso a cavidade torácica seja aberta ao final do estudo para colher um determinado tecido, aproveita-se para coletar o sangue do coração. Essa prática é comum e pode ser encontrada em muitos tipos de estudos com modelos animais, pois, em modelos nos quais se investigam várias doenças, existe a necessidade de controlar o número de leucócitos totais e diferenciais, considerando os vários pontos de sangramento ou técnicas, bem como, o gênero. Concluíram que a punção cardíaca pareceu ser a técnica mais rápida e confiável, obtendo-se o volume de sangue necessário, com menor quantidade de tensão exercida sobre o local de amostragem.

Schnell *et al.* (2002) determinaram o efeito do método de obtenção de sangue em parâmetros hematológicos para fornecer intervalos de referência, estudando camundongos, machos e fêmeas da linhagem C57BL/6. O sangue foi coletado por meio de um dos quatro métodos: intracardíaca (IC); uma única tentativa no momento da coleta da veia cava caudal (VC); a coleta da veia cava caudal mais qualquer sangue extravasado do peritônio (MC); ou retro-orbitária (RO). Os resultados demonstraram que os métodos de IC ou VC forneceram os resultados mais consistentes.

Almeida *et al.* (2008) observaram que a mensuração dos valores bioquímicos geralmente ocorre através de *pool*, provavelmente pelo pequeno volume de soro que se obtém de cada animal. O conhecimento dos valores dos diferentes parâmetros fisiológicos é critério importante para a avaliação da homeostase.

2.4 Parâmetros hematológicos: leucócitos, hemácias e plaquetas

O padrão fisiológico dos animais pode ser determinado por meio da avaliação sanguínea dos parâmetros hematológicos, bioquímicos e imunológicos (BORJESSON; CHRISTOPHER, 2000). Para Majerowicz (2005), as informações sobre a fisiologia de camundongos com fins de experimentação são essenciais, uma vez que testes hematológicos e bioquímicos são capazes de determinar a existência de alguma doença, validar drogas e propiciar a manutenção da própria colônia com animais de qualidade.

O conhecimento dos valores sanguíneos referentes aos parâmetros hematológicos e bioquímicos possibilita a caracterização adequada do perfil sanguíneo de cada espécie (ALMEIDA *et al.*, 2008). A caracterização correta destes parâmetros em valores de referência deve considerar algumas características próprias da espécie como o gênero, a linhagem, idade e condições de saúde.

Para Sanderson; Phillips (1981), as hemácias do camundongo são menores que as do homem, mais comparável à do rato. A hemácia do camundongo possui um diâmetro médio de 5 μm . O número de células imaturas em camundongos jovens proporciona um valor maior, cerca de 6 μm . O esfregaço sanguíneo do camundongo tem contagem maior de reticulócitos (3 a 4%) que o homem ao longo de toda sua vida; em consequência disso ocorre no esfregaço sanguíneo, a presença de

policromasia, e conseqüentemente a contagem alta de reticulócitos, que chega a 7% em camundongos jovens. As células vermelhas nucleadas estão presentes na proporção de uma célula para 100 leucócitos. River (1999) determinou, para o laboratório de referência, os parâmetros hematológicos para camundongos da linhagem SWISS, machos e fêmeas, em diferentes idades.

Reis et al. (2000) obtiveram os seguintes valores hematológico para os camundongos da linhagem Swiss, que formaram o grupo controle, quando avaliaram a atividade anti-inflamatória do extrato etanólico de própolis sobre o edema desencadeado por carragenina, dextrana e histamina, para Hm ($5.1 \pm 0.3 \times 10^6/\text{mm}^3$), Hb ($12.1 \pm 0.6 \text{ g/dL}$), Ht ($42.7 \pm 1.7\%$), VCM ($83.8 \pm 3.7\text{fL}$), HCM ($23.6 \pm 1.2 \text{ pg}$), CHCM ($28.3 \pm 0.8\%$), Neut. ($1575.7 \pm 313/\mu\text{L}$), Eos. ($61.5 \pm 41.6/\mu\text{L}$), Linf. ($5825.5 \pm 246.4/\mu\text{L}$) e Plaq. ($618.3 \pm 35.7/\mu\text{L}$).

Ponte (2003) obteve os seguintes valores para camundongos SWISS, machos e fêmeas, do grupo controle quando avaliou a toxicidade pré-clínica aguda e crônica: Hm (5.7 ± 0.1 e $5.1 \pm 0.1/\text{mm}^3$), Hb (17.4 ± 0.9 e $15.0 \pm 0.9 \text{ g/dL}$), Ht (52.8 ± 1.3 e $44.4 \pm 1.1\%$), VCM (93.4 ± 1.2 e $87.7 \pm 1.1 \text{ fL}$), HCM (94.0 ± 0.51 e $93.8 \pm 0.51 \text{ pg}$), CHCM (32.8 ± 0.3 e $33.1 \pm 0.3\%$). Em relação ao leucograma, obteve os seguintes valores de machos e fêmeas, respectivamente: Leuc. (8.725 ± 0.6 e $7640 \pm 0.5/\text{mm}^3$), Neut. (27.8 ± 5.2 e $32.8 \pm 4.6\%$), Eos. (2.4 ± 0.55 e $2.0 \pm 0.55\%$), Linf. (68.5 ± 5.2 e $63.6 \pm 4.7\%$), Plaq. (243.8 ± 34.1 e $301.6 \pm 30.5/\text{mm}^3$) e Mon. (3.3 ± 0.5 e $3.6 \pm 0.4\%$)

Verçosa Júnior et al. (2004), obtiveram para os animais controles, os valores: Hm ($7.23 \pm 1.74 \times 10^6/\text{mm}^3$), Hb ($10.7 \pm 2.55 \text{ g/dL}$), Ht ($30.86 \pm 7.78\%$), VCM ($42.57 \pm 1.13 \text{ fL}$), HCM ($15 \pm 1 \text{ pg}$), CHCM ($34.57 \pm 2.57\%$); Neut. ($0.25 \pm 0.21 \times 10^3/\text{mm}^3$), Leuc. ($2.96 \pm 1.22 \times 10^3/\text{mm}^3$), Linf. ($1.99 \pm 0.89 \times 10^3/\text{mm}^3$), Bast. ($0.07 \pm 0.07 \times 10^3/\text{mm}^3$) e Mon. ($0.25 \pm 0.12 \times 10^3/\text{mm}^3$).

Moreira (2007) obteve para os animais do grupo controle, os valores relacionados a seguir: Hm ($7.93 \pm 0.14 \times 10^6/\text{mm}^3$); Hb ($10.96 \pm 0.30 \text{ g/dL}$); Ht ($41.86 \pm .76\%$); VCM ($52.81 \pm 0.88 \text{ fL}$); HCM ($13.81 \pm 0.29 \text{ pg}$); CHCM ($26.15 \pm 0.30\%$) e Leuc. ($2.81 \pm 0.39 \times 10^3/\text{mm}^3$).

Vasconcelos et al. (2007) em estudo toxicológico pré-clínico agudo com o extrato hidroalcoólico de *Cissus sicyoides* L. (Cipó pucá ou Insulina vegetal), apresentaram para os animais do grupo controle, os resultados: Hm ($8.66 \pm 0.36 \times 10^6/\text{mm}^3$); Hb ($13.36 \pm 1.10 \text{ g/dL}$); Ht ($40.76 \pm 1.35\%$); VCM ($48.60 \pm 1.32 \mu^3$). HCM

(15.56 ± 0.51 µg); CHCM (32.54 ± 0.55%); Leuc. (8.16 ± 1.08 x 10³/mm³); Neut. (18.40 ± 1.94%); Eos. (0,36 ± 0,05%); Linf. (77.60 ± 3.70%); Pla. (254.00 ± 17.20 x 10³/mm³) e Mon. (2.00 ± 0.35%).

Melo *et al.* (2008) administrando frações de *Mascagnia rigida* em ensaio toxicológico em camundongos, apresentaram no grupo controle, os valores: Hm (9.658.000/µL); Hb (17.78 g/dL); Ht (47.7%); VCM (49.2 fL); HCM (16.32 pg) e CHCM (33.02 g/dL). Em relação ao leucograma, os valores foram: Neut. (0.516/µL); Leuc. (5.808/µL); Linf. (5.166/µL); Mon (0,124/µL) e Pla. (487.600/µL).

Rodrigues (2010) no estudo toxicológico com própolis vermelha obteve para os camundongos controles da linhagem SWISS, os valores: Hm (8.5 ± 0.34 x 10⁶/mm³); Hb (13.2 ± 0.80 g/dL); Ht (40.1 ± 1.2%); VCM (48.5 ± 1.3 µ³); HCM (15.5 ± 0.5µg); CHCM (32.4 ± 0.4%); Leuc. (8.3 ± 0.5 x 10³/mm³); Neut. (20.1 ± 2%), Eos. (0.8 ± 0.1%); Linf. (76.1 ± 3.8%); Pla. (261 ± 18 x 10³/mm³) e Mon. (2.0 ± 0.2%).

Monteiro (2010) afirma que o termo anisocitose indica o grau de variação de tamanho dos eritrócitos observado ao microscópio. Essa expressão é observada no hemograma automatizado através de dois parâmetros: amplitude de distribuição dos eritrócitos, medido como coeficiente de variação (RDW-CV) e amplitude de distribuição dos eritrócitos, medido com desvio padrão (RDW-SD). Estes parâmetros são calculados a partir do volume corpuscular médio (VCM), que representa a média do tamanho dos eritrócitos. Juntos, os dois parâmetros RDW e o VCM podem auxiliar no diagnóstico diferencial de diversas enfermidades, em especial alguns tipos de anemias. Os estudos de correlação mostraram que o RDW-CV tem alta relação com o VCM microcítico, enquanto que o RDW-SD tem maior relação com o VCM macrocítico.

Faria; Dal Bó, (2010) apontaram que laboratórios ignoram a informação do volume médio de plaquetas (VPM), fornecida nos analisadores hematológicos, porque o método é de difícil padronização e, em amostras de rotina, pode ser afetado por variáveis, como tecnologia, pacientes e efeitos dos anticoagulantes e variáveis pré-analíticas, como temperatura e tempo de estocagem do material. Por isso, os autores aconselham que cada laboratório estabeleça seu próprio valor de referência, pois sua determinação é importante no diagnóstico de pacientes com distúrbios plaquetários, particularmente nas trombocitopenias e trombocitoses.

Xavier (2011) ao trabalhar com óleo essencial das folhas de *Lippia microphylla* Cham. (Alecrim dos gerais) e o óleo essencial das folhas de *L. microphylla*, através

de ensaios *in vivo* e *in vitro*, teve como objetivo a avaliação da atividade antitumoral e toxicidade em camundongos da linhagem SWISS de 60 dias, com 28 a 32 gramas. Obteve no grupo controle os seguintes valores: Hm ($8.46 \pm 0.10/\mu\text{L}$); Hb ($14.37 \pm 0.12 \text{ g/dL}$); Ht ($47.55 \pm 0.61\%$); VCM ($56.22 \pm 0.20 \text{ fL}$); HCM ($17.27 \pm 0.13 \text{ pg}$) e para CHCM ($29.42 \pm 0.09 \text{ g/dL}$). Em relação aos valores leucocitários, foram encontrados: Leuc. ($7.97 \pm 0.67 \times 10^3/\text{mm}^3$); Neut. ($27.83 \pm 1.68\%$); Linf. ($76.00 \pm 1.48\%$); Mon. ($1.33 \pm 0.21\%$) e Eos. ($1.67 \pm 0.21\%$).

2.5 Parâmetros Bioquímicos Séricos

A determinação dos parâmetros bioquímicos fornece importantes informações com relação ao estado clínico do animal, balanço nutricional, situações deficitárias, monitorações de tratamentos e prognósticos (GONZÁLEZ *et al.*, 2001).

Silveira (1988) descreve que a proteína total compreende todas as proteínas do sangue, estando aí incluída a albumina, globulinas (alfa, beta e gama), dentre as beta globulina, está o fibrinogênio e complementadas com os fatores da coagulação. Todas as proteínas são sintetizadas no fígado com exceção da fração gama das globulinas, cuja síntese depende do sistema linfático, particularmente o baço. As proteínas são as substâncias orgânicas que desempenham o maior número de funções no organismo animal, como na manutenção da pressão sanguínea; funcionam ainda no transporte de hormônios, minerais e lipídios. As proteínas sofrem alterações de importância clínica, principalmente nos processos inflamatórios (bacterianos e imunológicos), parasitários e metabólicos.

A creatinina é um produto nitrogenado não protéico, resultante do fosfato de creatina. Kerr (2003) descreve que existe em grande quantidade nos músculos (esquelético e cardíaco), fígado e rins. Uma propriedade importante da creatinina é ter um limiar baixo, por isso toda quantidade que chega aos rins é eliminada. Propriedade essa que a torna clinicamente utilizável como índice de filtração glomerular renal. O aumento de creatinina no sangue ocorre em todas as doenças renais em que há diminuição da taxa de filtração glomerular. A dosagem de

creatinina deve ser realizada em paralelo com a uréia, para melhor avaliação da reversibilidade da lesão.

O colesterol total é a segunda maior fração dos lipídeos plasmáticos. A primeira pertence aos fosfolipídios. O colesterol pode ser ingerido pela dieta ou formado a partir de triglicérides e outros ácidos graxos no organismo, sendo esterificado no fígado, e entra na composição dos ácidos biliares excretados no intestino. É transportado no plasma, como os demais lipídeos, complexado às proteínas (albumina e haptoglobulina), e seu aumento pode indicar alteração no metabolismo energético dos animais (THRALL, 2004).

A albumina é a maior reserva de armazenamento de proteínas e transportadora de aminoácidos. A sua atividade é de aproximadamente 75% da pressão osmótica do plasma. Outra função é a de ligação geral e de transporte. A ligação da albumina com substâncias solúveis ou não no plasma permite seu efeito transportador. Também previne a perda dos componentes químicos do plasma pelos rins (KANEKO, 2008).

Em trabalho com camundongos SWISS machos, Moreira (2007) procurou avaliar a toxicidade do extrato aquoso de uma floração de cianobactérias contendo microcistinas, cujos animais controle apresentaram os valores a seguir: ALT (45.00 ± 3.07 U/L), Trig. (136.08 ± 30.62 mg/dL), PPT (4.28 ± 0.17 g/dL), Alb. (2.94 ± 0.14 g/dL), Glob. (1.34 ± 0.13 g/dL) e Crea (0.32 ± 0.02 mg/dL).

Em ensaio utilizando a *Mascagnia rigida*, Melo *et al.* (2008) obtiveram os seguintes valores para fêmeas de camundongo SWISS, do grupo controle: ALT (43.2 UI) e proteínas totais (5.2 g/dL).

Silva (2009) utilizou *Artemisia vulgaris* (artemísia) com propriedades anti-helmíntica e antimalárica; *Aloe vera* (babosa) com ação antidiabética, laxante e anti-inflamatória e Benzonidazol como tripanomicida em sua pesquisa. Os animais controle apresentaram valores séricos para Colesterol de 134.70 ± 09.50 mg/dL e para ALT de 74.70 ± 10.40 U/L.

Nos estudos, Rodrigues (2010) administrando extrato de Própolis Vermelha padronizado em camundongos SWISS, obteve os seguintes valores do grupo controle: ALT (54.2 ± 3.2 U/L), Col. (82.1 ± 2.2 mg/dL), Trig. (109 ± 5.4 mg/dL), PPT (6.5 ± 0.5 mg/dL) e Crea (0.39 ± 0.04 mg/dL).

A pesquisa de Spinelli *et al.* (2012) com parâmetros bioquímicos, trabalhando com machos e fêmeas de camundongos da linhagem SWISS, e outras duas

linhagens, com idade entre 10-11 semanas, descreve que devido à carência de dados bibliográficos, principalmente no âmbito nacional, propuseram a obtenção de valores bioquímicos plasmáticos, de forma a auxiliar na caracterização desses e oferecer ao pesquisador dados que possam ajudá-lo em seus experimentos.

Os resultados obtidos por esses autores para camundongos machos foram os seguintes: ALT (23.60 ± 4.80 U/L), Crea ($0.28 \pm 0,15$ mg/dL, Col. (140.00 ± 26.05 mg/dL), Trig. (79.60 ± 33.30 mg/dL), VLDL (15.92 ± 15.92 mg/dL), PPT (4.458 ± 0.62 g/dL), Alb. (2.48 ± 1.72 g/dL) e Glob. (5.242 ± 7.43 g/dL). Para as fêmeas, os valores foram os seguintes: ALT (24.20 ± 9.17 U/L); Crea (0.14 ± 0.04 mg/dL); Col. (99.80 ± 8.88 mg/dL); Trig. (95.00 ± 14.56 mg/dL); VLDL (19.00 ± 2.91 mg/dL); PPT. (4.758 ± 0.20 g/dL); Alb. (2.420 ± 6.85 g/dL) e Glob. (2.338 ± 6.34 g/dL).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente trabalho objetiva avaliar o ganho ponderal e os parâmetros hematológicos e bioquímicos séricos de camundongos (*Mus musculus*) da linhagem SWISS do Biotério Central da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, MS.

3.2 Objetivos específicos

- a. Determinar e comparar os valores para o peso de camundongos (*Mus musculus*) da linhagem SWISS, machos e fêmeas, em diferentes idades (30, 45, 60, 75, 90, 105 e 120 dias).
- b. Determinar os valores para os parâmetros eritrocitários: hemácias, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média, concentração de hemoglobina corpuscular média, largura da distribuição

de hemácias relacionada ao desvio padrão, largura da distribuição de hemácias relacionada ao volume corpuscular, plaquetas, volume médio de plaquetas.

- c. Determinar os valores para os parâmetros leucocitários: leucócitos totais e específicos: neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos.
- d. Determinar os valores para os parâmetros bioquímicos séricos, para os analitos: albumina, proteína sérica, alanina amino transferase, colesterol, creatinina, triglicérides, globulina, relação albumina:globulina (A:G) e lipoproteína de muito baixa densidade.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos realizados neste trabalho foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFMS, sob o protocolo n° 354 de 20/10/2011, em anexo.

4.1 Seleção dos animais e manutenção

Foram utilizados 14 camundongos (*Mus musculus*) da linhagem SWISS (Fig. 1) sendo sete machos e sete fêmeas, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS. Os animais foram distribuídos, de forma aleatória, em duas gaiolas de polipropileno medindo 30x20x13 cm, com quatro animais e duas gaiolas com três, as quais, por sua vez, foram mantidas em estantes ventiladas do Setor de Experimentação do Biotério.



Figura 1. Camundongos da Linhagem SWISS em caixas de polipropileno com maravalha.

Os animais permaneceram nas estantes ventiladas (Fig. 2) com temperatura em torno de 22^oC, umidade relativa do ar em torno de 60% e fotoperíodo de 12/12 horas, controladas para a espécie.



Figura 2. Estantes ventiladas alocadas no Setor de Experimentação do Biotério Central- UT/CCBS/UFMS.

Para cada caixa foram fornecidas ração comercial CR1 Nuvital-Nuvilab® e água à vontade, sem horário de jejum para obtenção de amostra sanguínea. Os animais foram pesados antes do início de cada procedimento, em balança eletrônica, de três dígitos da marca Gehaka®.

4.2 Procedimentos para coleta de sangue

A manipulação (Fig. 3) e obtenção de amostras foram feitas por profissional especializado e com prática na coleta de sangue de animais de laboratório.



Figura 3. Camundongo sendo contido para receber anestésico.

Cada camundongo antes da coleta foi submetido à sedação com 0,1 mL/100 g de peso vivo da associação de Xilazina a 2% e Cetamina a 10%, na proporção de 1:1, por via intramuscular (Fig. 4), com seringa descartável de 1 mL e agulha de 13 x 4,5 mm.



Figura 4. Camundongo recebendo anestésico por via Intramuscular.

Os camundongos após sedação foram contidos (Figura 4) para obtenção de amostra de sangue, por via intracardíaca (Fig. 5) aos 30, 45, 60, 75, 90, 105 e 120 dias após o nascimento.

Foi coletado 0,8 mL de sangue total, com seringa descartável de 1 mL e agulha de 13 x 4,5 mm, para animais na faixa etária de 30 a 45 dias e, com agulha de 26 x 6 mm, para os camundongos com idade acima de 45 dias.



Figura 5. Obtenção de amostra de sangue por via Intracardíaca.

Do volume total de sangue de cada amostra, 0,4 mL foi colocado em Eppendorf contendo EDTA (Fig. 6) para realização de hemograma, e 0,4 mL em Eppendorf sem anticoagulante (Fig. 7) para bioquímica sérica. Todas as amostras foram devidamente identificadas.



Figura 6. Amostra de sangue em frasco com anticoagulante.



Figura 7. Amostra de sangue em frasco sem anticoagulante.

4.3 Parâmetros Hematológicos: leucócitos, hemácias e plaquetas

Para o hemograma, a amostra de sangue foi armazenada em tubo Eppendorf pediátrico contendo 10 μ L de anticoagulante (EDTA). Todos os parâmetros foram

quantificados com o aparelho da marca Sysmex XE 2100 (Fig. 8) do Laboratório de Análises Clínicas/ NHU/ UFMS.



Figura 8. Aparelho automatizado para exames hematológicos da marca Sysmex XE 2100 do Laboratório do NHU / UFMS

A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em lâminas de 26 x 76 mm e corada pelo método rápido Panótico, da marca Laborclin®. Para observação dos elementos figurados do sangue foi utilizado microscópio óptico, marca Olympus®CX 41 e objetiva de imersão. Após a leitura, as lâminas foram microfotografadas no equipamento para captura de imagens, marca Leica DM, 5.500 B, (Fig. 9), do Laboratório de Captura de Imagens do CCBS/UFMS.



Figura 9. Equipamento para captura de imagens marca Leica DM, 5.500 B, do Laboratório de Captura de Imagens do CCBS/ UFMS

4.4 Parâmetros bioquímicos séricos

Para bioquímica, 0.4 mL do sangue coletado foi colocado em tubo Eppendorf para obtenção do soro, por processo de centrifugação a 2000 rpm (centrífuga FANEN[®]) durante 10 minutos, obtendo-se soro livre de hemólise. Após a separação do soro, as amostras foram congeladas a -20°C, até a realização dos exames, quando foram descongeladas à temperatura ambiente.

Os analitos séricos albumina (Alb.), proteína sérica (Ps), alanina amino transferase (ALT), colesterol (Col), creatinina (Crea), triglicérides (Trig), relação albumina:globulina (A:G), lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) e globulina (Glob.), foram realizados com os Kits próprios do aparelho de bioquímica da marca Cobas[®]Integras 400 (Fig. 10), para 15 tubos por vez, e necessidade mínima de 100 µL de soro.



Figura 10. Aparelho automatizado para Análises Bioquímicas, marca Cobas® Integras 400 do NHU/UFMS.

4.5 Eutanásia

Após o término das coletas de sangue dos grupos, todos os animais foram submetidos à eutanásia. Para tanto, foi utilizado o anestésico Tiopental Sódico em dose letal de 150 mg/kg, pela via intraperitoneal.

4.6 Análise estatística

Os resultados foram avaliados por meio do teste ANOVA de duas vias de medidas repetitivas, sendo que as interações e as idades em cada gênero foram comparadas por meio do teste ANOVA de uma via de medidas repetitivas, seguida pelo Pós-teste de Tukey, enquanto que os gêneros, em cada idade, foram comparados por meio do teste *t-student*. A análise estatística foi realizada utilizando-se o “Software” SIGMASTAT, versão 2.0, considerando um nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Parâmetros para o peso dos animais

Considerando o peso dos animais, machos e fêmeas antes de cada procedimento, o gênero ($p < 0,01$); idade ($p < 0,01$) e interação entre gênero e idade ($p < 0,001$) foram observadas diferenças significativas em tais parâmetros. (tabela 1).

Tabela 1 – Valores médios e desvio padrão do peso de camundongos jovens e adultos, machos e fêmeas, da linhagem SWISS, antes de cada procedimento.

Peso médio (g)	Idade dos animais (dias)						
	30	45	60	75	90	105	120
Fêmeas	22,99±0,88	22,83±1,42	26,74±2,94	30,25±2,60	37,75±4,35	27,600±0,94	34,96±2,46
Machos	27,05±1,12	28,54±1,00	33,06±2,24	37,90±2,28	29,25±2,92	39,29±1,41	36,45±2,11

$p < 0,001$ (Anova seguido de Tukey)

Pesquisas demonstraram diferenças entre gêneros e pesos de camundongos SWISS utilizados em experimentação, como Souza (2003) em pesquisa com machos e fêmeas de 25 a 30 gramas; Verçosa Júnior *et al.* (2004) com fêmeas pesando entre 25 e 30 gramas e Melo *et al.* (2008) com fêmeas entre 25 e 30 gramas. Outros pesquisadores utilizaram apenas machos, como Silva (2009) que relatou peso entre 18 e 20 gramas; Guimarães (2011) peso de 30 gramas, Xavier (2011) peso entre 28 a 32 gramas e Rodrigues (2010) peso entre 20 a 30 gramas.

Este projeto utilizou fêmeas de 30 dias pesando 22.99 ± 0.88 g e de 120 dias pesando 34.96 ± 2.46 g e machos com 30 dias pesando 27.05 ± 1.12 g e com 120 dias pesando 36.45 ± 2.11 g, não sendo possível fazer comparações com os outros autores.

Na comparação entre idades nos machos, o peso aos 75 e aos 105 dias foi maior que aos 30, 45, 60 e 90 dias; aos 60 e 120 dias foi maior que aos 30, 45 e 90 dias e, aos 60 dias, maior que aos 30, 45 e 90 dias.

Na comparação entre idades nas fêmeas, o peso aos 90 e 120 dias foi maior que aos 30, 45, 60, 75 e 105 dias; aos 75 dias foi maior que aos 30, 45 e 60 dias.

Considerando o peso aos 60 e 105 dias, estes foram maiores que aos 30 e 45 dias, sem diferença significativa entre as diferentes idades.

Na comparação entre gêneros, nas idades 30, 45, 60, 75 e 105 dias, os machos apresentaram maiores pesos que as fêmeas. As fêmeas estiveram mais pesadas que os machos na idade de 90 dias. Na comparação entre gêneros na idade 120 dias não houve diferença significativa.

5.2 Parâmetros relacionados à técnica de coleta de sangue

Os animais utilizados neste trabalho permaneceram vivos durante todo o período das coletas, iniciada aos 30 dias. Segundo Schanaider; Silva (2004), a anestesia combinada da cetamina e xilazina, por via intramuscular, é uma das mais utilizadas em animais de pequeno porte, por manter o animal em plano anestésico de 40 a 60 minutos, com possibilidade de reforço da dose.

Pode-se observar que não houve alteração digna de nota, pela retirada de 0,8 mL de sangue por via intracárdica em intervalo de 15 dias, visto que os animais mantiveram-se vivos durante todo o período deste experimento, para trabalho semelhante, Spinelli *et al.* (2012) obtiveram a quantidade de 700 μ L (0,7 mL), por punção submandibular, em animais com idade de 10 a 11 semanas. Melo *et al.* (2008) em ensaio toxicológico, coletaram 0,3 mL de sangue em camundongos, no espaço retro-orbital, com o auxílio do tubo de microhematócrito.

Para Doieng *et al.* (2003) a punção cardíaca é uma técnica nem sempre prática, e deve-se estar ciente das diferenças nas variáveis sanguíneas em relação ao gênero e método de coleta de sangue. Segundo os autores do presente trabalho, esta observação aplica-se a animais com menos de 45 dias e com peso abaixo de 28.83 ± 1.42 g para fêmeas e 28.54 ± 1.00 g para machos. Deve-se considerar ainda a experiência do pessoal nesse tipo de obtenção de amostra sanguínea em camundongos da linhagem SWISS, em Biotério convencional, com ambiente controlado, como ocorreu neste trabalho.

Para Schnell *et al.* (2002), o método de obtenção de sangue pela veia cava (VC) foi associado a mínima variação em ambos os gêneros e pareceu ligeiramente melhor do que o método intracárdico (IC). Fernández *et al.* (2010) demonstraram

que os resultados pela obtenção de sangue pela veia submandibular e retro-orbitária afetam os parâmetros usados para avaliar a saúde animal.

Esses mesmos autores sugerem cuidado quando compararem os resultados da análise bioquímica de sangue obtido a partir da veia submandibular em camundongos, com valores de referência obtidos por outras técnicas de amostragem de sangue. O presente trabalho demonstrou que a punção intracardiaca permite a recuperação rápida do animal, mas recomenda-se o uso de tranquilizante e pessoas habilitadas, isto é, a presença do médico veterinário, visto que mesmo ao segurar o animal já há manifestações de estresse agudo com liberação de adrenalina que induz a mobilização de neutrófilos, elevando desta forma os valores de neutrófilos e em consequência os leucócitos totais, esta é a manifestação da leucocitose fisiológica, no leucograma, (SMITH, 2000).

5.3 Parâmetros Hematológicos Leucocitários

5.3.1 Leucócitos totais

Neste trabalho, o número para leucócitos totais não apresentaram diferença significativa em relação ao gênero ($p=0,123$), mas os valores são diferentes em relação à idade ($p<0,001$) e também entre gênero e idade ($p=0,002$). Enquanto River (1999) obteve valores máximos no sangue dos machos, para leucócitos ($12.9 \times 10^3/\text{mm}^3$) e mínimos para fêmeas ($3.0 \times 10^3/\text{mm}^3$), em diferentes idades, para camundongos dessa mesma linhagem, Ponte (2003) apresentou valores para Leuc. ($8.725 \pm 0.6/\text{mm}^3$) e ($7.640 \pm 0.5/\text{mm}^3$), machos e fêmeas, respectivamente. Em pesquisa com animais de 60 dias e 28 a 32 gramas, Xavier (2011) relatou valores de ($7.97 \pm 0.67 \times 10^3/\text{mm}^3$); Verçosa Júnior *et al.* (2004) obtiveram valores para leucócitos totais no sangue de fêmeas com 25 a 30 g, ($2.96 \pm 1.22 \times 10^3/\text{mm}^3$) e Moreira (2007), ($2.81 \pm 0.39 \times 10^3/\text{mm}^3$) em machos.

A presente pesquisa reforça a afirmação de Doeing *et al.* (2003), os quais dizem que, em diferentes modelos animais, investigando várias doenças, há necessidade de se determinar o número de leucócitos totais e diferenciais, uma vez que neste trabalho, mesmo em animais saudáveis, observou-se diferença significativa nos leucócitos totais em relação a idade, mas não em relação ao gênero.

Observou-se que nos machos de 90 dias, o número de leucócitos, na comparação entre idades, foi maior que nos demais e nos animais com 60 dias, foi maior que 75 e 105 dias. Nas fêmeas, porém, não houve diferença entre as idades. Comparando os gêneros e as idades de 60 e 90 dias, foram maiores nos machos que nas fêmeas; nas demais idades não houve diferença significativa.

5.3.2 Neutrófilos

Os neutrófilos, em relação ao gênero ($p=0,003$) e a idade ($p<0,001$), apresentaram diferença estatística, porém, não houve diferença entre gênero e idade ($p=0,204$). Para River (1999), os valores relativos de neutrófilos para machos variaram de 25% a 27% e, para fêmeas de 19% a 29%; Ponte (2003) obteve para machos e fêmeas valores de $27.8 \pm 5.2\%$ e $32.8 \pm 4.6\%$, respectivamente. Xavier (2011) com $27.83 \pm 1.68\%$ para animais com 60 dias de idade e Vasconcelos *et al.* (2007) apresentaram valores de $18.40 \pm 1.94\%$ para animais adultos. No presente trabalho os valores relativos variaram de $18,30 \pm 6,04\%$ para fêmeas com 30 dias a $7,63 \pm 2,80\%$ com 120 dias, e $19,74 \pm 4,71\%$ para machos de 30 dias a $14,97 \pm 3,52\%$ com 120 dias, nas outras idades os valores estiveram entre estes valores.

A Figura 11a e b mostram os neutrófilos segmentados no esfregaço de sangue periférico de machos e fêmeas, respectivamente.

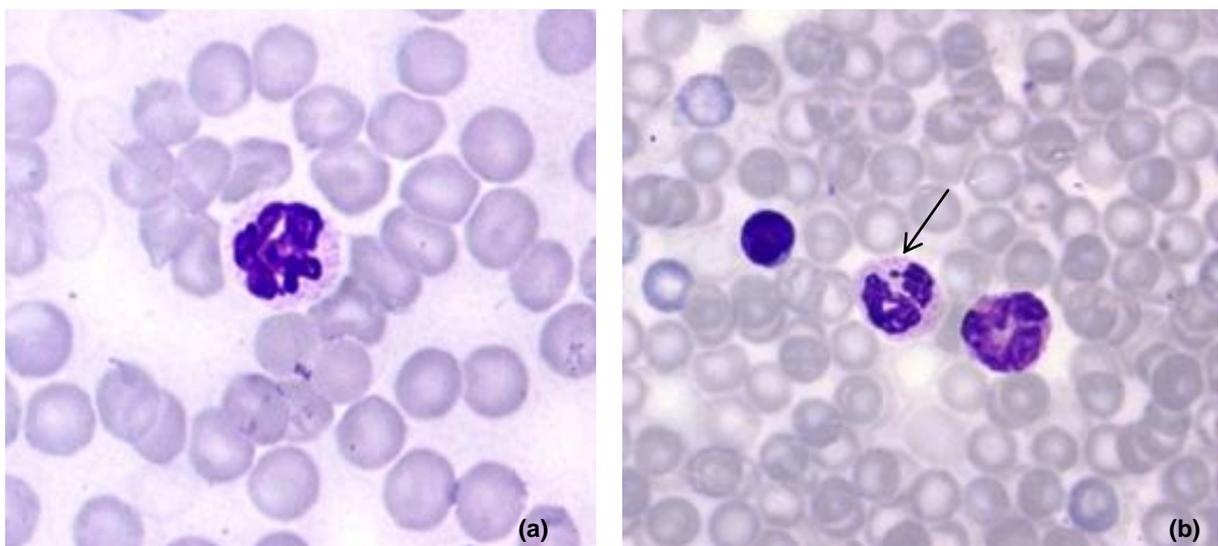


Figura 11. Neutrófilos segmentados nos esfregaços sanguíneos de camundongos macho (a) e fêmea (b), da linhagem Swiss. Corado com Panótico. Objetiva de imersão.

Tabela 2 – Valores relativos médios com desvio padrão e valores absolutos obtidos no leucograma de camundongos jovens e adultos machos e fêmeas da linhagem SWISS.

Variável	Idade dos animais (dias)													
	30		45		60		75		90		105		120	
Leucócitos	$10^3/\mu\text{L}$	$/\mu\text{L}$	$10^3/\mu\text{L}$	$/\mu\text{L}$	$10^3/\mu\text{L}$	$/\mu\text{L}$	$10^3/\mu\text{L}$	$/\mu\text{L}$	$10^3/\mu\text{L}$	$/\mu\text{L}$	$10^3/\mu\text{L}$	$/\mu\text{L}$	$10^3/\mu\text{L}$	$/\mu\text{L}$
Fêmeas	5,04±1,84	5040,00	4,39±1,12	4390,00	3,29±0,56	3290,00	3,26±0,89	3260,00	3,89±1,23	3890,00	3,38±0,42	3380,00	3,07±1,20	3070,00
Machos	4,92±2,29	4920,00	3,57±0,85	3570,00	6,07±2,78	6070,00	2,50±0,64	2500,00	6,42±2,66	6420,00	2,36±0,91	2360,00	3,97±2,64	3970,00
Neutrófilos	%	$/\mu\text{L}$	%	$/\mu\text{L}$	%	$/\mu\text{L}$	%	$/\mu\text{L}$	%	$/\mu\text{L}$	%	$/\mu\text{L}$	%	$/\mu\text{L}$
Fêmeas	18,30±6,04	922,32	16,34±4,24	717,33	14,69±3,42	483,3	14,30±2,74	466,18	10,66±1,11	414,67	11,43±3,83	386,33	7,63±2,80	234,24
Machos	19,74±4,71	971,21	19,53±2,18	697,22	12,93±3,94	784,85	16,19±7,46	404,75	12,81±5,63	822,40	16,06±5,45	379,02	14,97±3,52	594,31
Linfócitos														
Fêmeas	79,86±4,61	4024,94	82,77±4,31	3633,60	86,64±4,63	2850,46	84,40±2,92	2751,44	88,84±1,33	3455,88	91,54±2,91	3094,05	91,54±2,91	3634,14
Machos	79,13±3,71	3893,20	78,09±4,37	2787,81	87,74±3,58	5325,82	81,99±7,28	2049,75	86,11±5,96	5528,26	84,24±5,35	1988,06	84,07±2,93	3337,58
Monócitos														
Fêmeas	3,09±1,74	155,74	0,81±0,45	35,56	0,80±0,64	26,32	1,20±1,03	39,12	0,44±0,27	17,12	0,49±0,65	16,56	0,64±0,71	19,65
Machos	2,93±1,29	144,16	0,69±0,49	24,63	1,13±0,70	68,59	1,80±1,23	45,00	1,09±0,70	69,98	1,93±0,98	45,55	1,43±0,88	56,77
Eosinófilos														
Fêmeas	0,00±0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,04±0,11	1,32	0,00±0,00	0,00	0,03±0,08	1,17	0,09±0,23	3,04	0,00±0,00	0,00
Machos	0,00±0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,11±0,20	6,68	0,03±0,08	0,75	0,19±0,23	12,20	0,00±0,00	0,00	0,00±0,00	0,00
Basófilos														
Fêmeas	0,09±0,11	4,54	0,07±0,13	3,07	0,09±0,15	2,96	0,10±0,17	3,26	0,03±0,08	1,17	0,09±0,16	3,04	0,10±0,26	3,07
Machos	0,13±0,14	6,40	0,00±0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,04±0,08	1,00	0,13±0,22	8,35	0,04±0,11	0,94	0,10±0,26	3,97

Para os valores absolutos de neutrófilos no sangue periférico de camundongos da linhagem Swiss, Melo *et al.* (2008) obtiveram $0.516/\mu\text{L}$ para fêmeas semelhante aos animais machos com 120 dias deste trabalho e Reis, *et al.* (2000) apresentaram valores de $1.575.7 \pm 313/\mu\text{L}$, enquanto que no presente trabalho obteve-se $922.32/\mu\text{L}$ para fêmeas de 30 dias a $234,24/\mu\text{L}$ para 120 dias. Os machos de 30 dias apresentaram valores absolutos de $971,21/\mu\text{L}$ a $594,31/\mu\text{L}$ para animais de 120 dias, diferindo de Reis, *et al.* (2000).

O número de neutrófilos relativos nos animais com a idade de 30 dias foi maior que com 60, 90, 105 e 120 dias. Na idade de 45 dias foi maior que nas idades de 90 e 120 dias. E, o número de neutrófilos absolutos nas fêmeas foram maiores nas idades de 45, 75 e 105, quando comparado com os machos.

5.3.3 Linfócitos

Os valores dos linfócitos, em relação ao gênero ($p=0,001$) e idade ($p<0,001$), apresentaram diferença nos resultados, mas não houve diferença significativa para a interação entre gênero e idade ($p=0,223$). River (1999) obteve os seguintes valores máximos e mínimos para diferentes idades de machos e fêmeas: 70% e 72%, e 75% e 66%; Ponte (2003) relata valores médios de $68.5 \pm 63.6\%$ e $63.6 \pm 4.7\%$; Vasconcelos *et al.* (2007) cita valores de $77.60 \pm 3.70\%$; à semelhança de Rodrigues (2010) com valores de $76.1 \pm 3.8\%$ e Xavier (2011) com valores de linf de $76.00 \pm 1.48\%$.

Os valores citados são menores que os valores obtidos neste experimento, em que os valores mínimos e máximos para macho foram de $78.09 \pm 4.37\%$ e $87.74 \pm 3.58\%$ e para fêmeas $79.86 \pm 4.61\%$ e $91.54 \pm 2.91\%$. O número de linfócitos nas idades 60, 90, 105 e 120 dias foram maiores que com 30 e 45 dias de vida, e entre sexos, os linfócitos das fêmeas, apresentaram maior número de linfócitos relativos que os valores obtidos para os machos (Fig. 12 a,b).

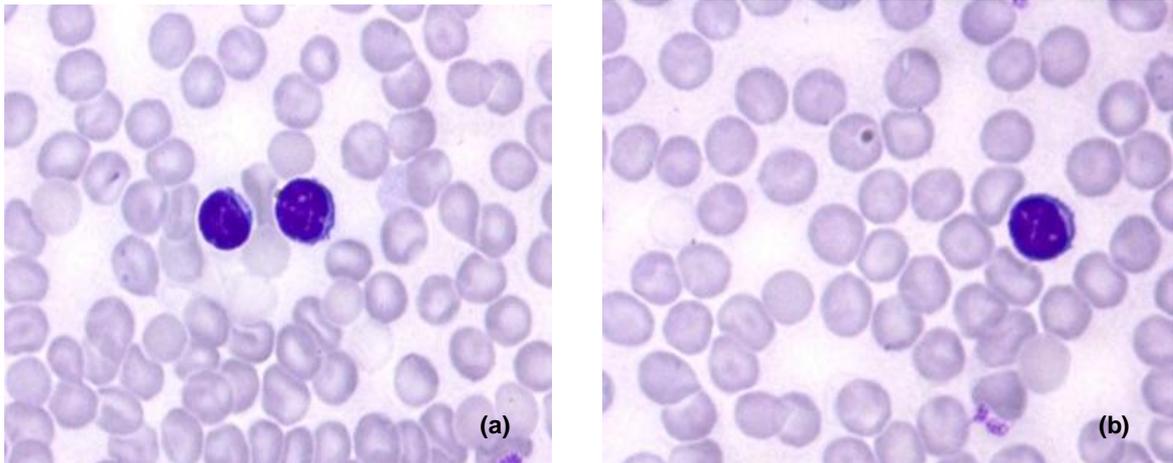


Figura 12. Linfócitos nos esfregaços sanguíneos de camundongos macho (a) e fêmea (b), da linhagem SWISS. Corado com Panótico. Objetiva de imersão.

Para os valores absolutos Reis *et al.* (2000) quantificaram Linf. em $5.825.5 \pm 246.4/\mu\text{L}$ e Melo *et al.* (2008) com $5.166/\mu\text{L}$, concordando com o presente estudo, pois o sangue coletado das fêmeas apresentou $4.024,94/\mu\text{L}$ e para os machos $3.893,20/\mu\text{L}$ com a idade de 30 dias. Os valores obtidos de $3.634,14/\mu\text{L}$ para as fêmeas e $3.337,58/\mu\text{L}$ para os machos de 120 dias e diferem de Verçosa Júnior *et al.* (2004) que relatam valores de $1.99 \pm 0.89 \times 10^3/\text{mm}^3$.

5.3.4 Monócitos

Quanto aos monócitos, em relação ao sexo ($p=0,008$) e idade ($p<0,001$) houve diferença nos resultados, mas não na relação entre sexo e idade ($p=0,275$). Charles River (1999) apresentou valores de monócitos, 2% e 4% para fêmeas e machos, em diferentes idades. Ponte (2003) apresentou valores para machos e fêmeas de $3.3 \pm 0.5\%$ e $3.6 \pm 0.4\%$, respectivamente; Vasconcelos (2007) citou valores de $2.00 \pm 0,35\%$ mas não especificou sexo; Rodrigues (2010) relatou valores de $2.0 \pm 0.2\%$ para machos e Xavier (2011), obteve valor de $1.33 \pm 0.21\%$, sem especificar o sexo.

O número relativo de monócitos, na idade de 30 dias, foram valores maiores que as idades de 45, 60, 75, 90, 105 e 120 dias; e o número de monócitos com os respectivos valores máximos, mínimos e desvio padrão foram de $2.93 \pm 1.29\%$ e $0.69 \pm 0.49\%$, para machos, e $3.9 \pm 1.74\%$ e $0.44 \pm 0.27\%$, para as fêmeas (Fig. 13 a e b), sendo, portanto, valores semelhantes aos demais autores.

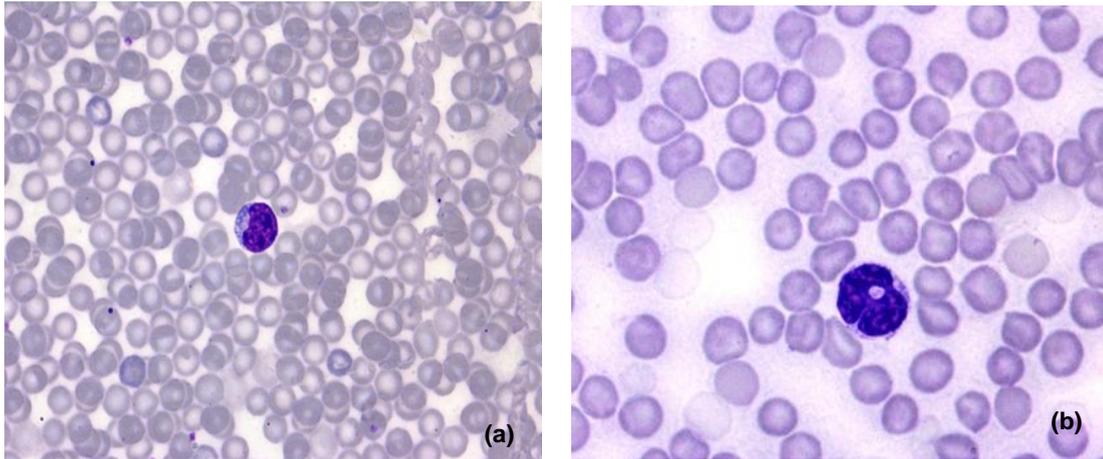


Figura 13. Monócitos nos esfregaços sanguíneos de camundongos macho (a) e fêmea (b), da linhagem Swiss. Corado com Panótico. Objetiva de imersão.

Para os valores absolutos, Verçosa Júnior *et al.* (2006) citaram quantidades de $0.25 \pm 0.12 \times 10^3/\text{mm}^3$ para fêmeas e Melo (2008), valor de $0.124/\mu\text{L}$ para fêmeas; enquanto neste trabalho obteve-se valores de $155,74/\mu\text{L}$ para as fêmeas e $144,16/\mu\text{L}$ para os machos de 30 dias, enquanto obteve-se $19,65/\mu\text{L}$ para as fêmeas e $56,77/\mu\text{L}$ para os machos de 120 dias. Diferem dos autores citados, em relação a este fato, deve-se esclarecer que a contagem relativa de células sanguíneas servem para que se calcule os valores absolutos, e são com esses valores que se avalia o estado fisiológico ou fisiopatológico dos animais.

5.3.5 Eosinófilos

Os eosinófilos, em relação ao gênero ($p=0,277$) e idade ($p=0,057$), assim como entre gênero e idade ($p=0,156$), não apresentaram diferença nos valores encontrados. Em relação aos valores relativos de eosinófilos e comparando com outras pesquisas, River (1999) obteve 1% para machos e 2 a 4% para fêmeas; Ponte (2003) obteve $2.4 \pm 0.55\%$ para machos e $2.0 \pm 0.55\%$ para fêmeas e Vasconcelos *et al.* (2007) obtiveram $0.36 \pm 0.05\%$ para machos. Relatando valores de eosinófilos sem relatar o gênero estão: Rodrigues (2010) com $0.8 \pm 0.1\%$ e Xavier (2011) com $1.67 \pm 0.21\%$.

Na presente pesquisa, os valores máximos obtidos para machos foram de $0.19 \pm 0.23\%$ e para fêmeas foram de $0.09 \pm 0.23\%$. Essa comparação mostra, portanto,

valores menores que dos autores citados, e sem diferença significativa, para valores relativos de eosinófilos de machos e eosinófilos de fêmeas (Fig. 14 a e b).

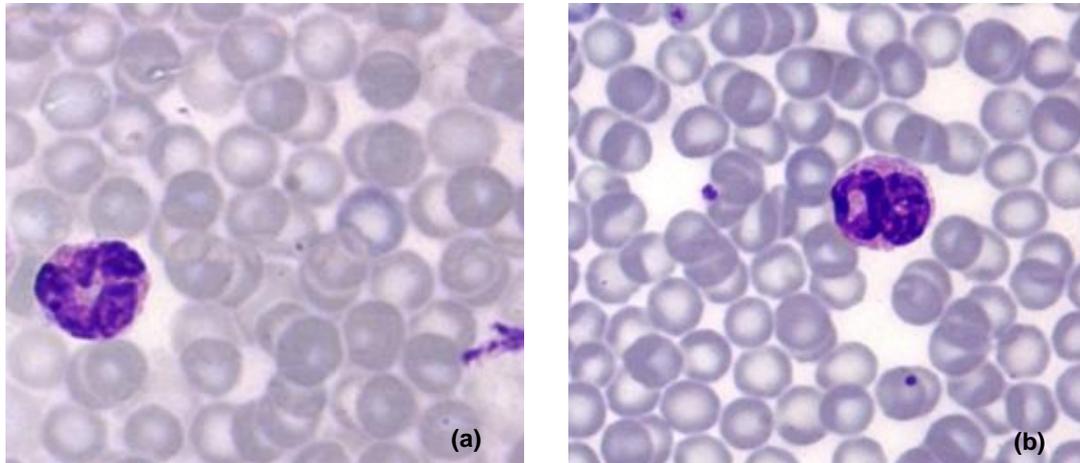


Figura 14. Eosinófilos nos esfregaços sanguíneos de camundongos macho (a) e fêmea (b), linhagem SWISS. Corado com Panótico. Objetiva de imersão.

Considerando os valores absolutos de eosinófilos, Reis *et al.* (2000) obtiveram $61.5 \pm 41.6/\mu\text{L}$, enquanto neste trabalho se observou eosinófilos somente na idade de 60 dias ficando as fêmeas com $1,32/\mu\text{L}$ e os machos com $6,68/\mu\text{L}$, diferindo do autor citado.

5.3.6 Basófilos

Os basófilos não tiveram diferença nos resultados em relação ao gênero ($p=0,603$) e a idade ($p=0,866$), e entre gênero e idade ($p=0,675$). Tendo River (1999), observado valores de (0%) para basófilos de machos e fêmeas em diferentes idades, outros autores não apresentaram valores.

Os animais aqui estudados obtiveram número percentual de basófilos no sangue dos machos de $0.13 \pm 0.23\%$ e das fêmeas de $0.10 \pm 0.26\%$ e $0.03 \pm 0.08\%$, valores máximos e mínimos, respectivamente, apesar de não terem apresentado diferença significativa em relação ao gênero ou idade.

Em relação aos valores absolutos obteve-se o maior quantidade nos animais fêmeas de 30 dias com $4,54/\mu\text{L}$ basófilos e nos machos o maior valor foi de $8,35/\mu\text{L}$ aos 90 dias.

5.4 Parâmetros Hematológicos Eritrocitários e Plaquetas

5.4.1 Eritrócitos

O teste utilizado na pesquisa mostrou diferença estatística nos eritrócitos, em relação ao gênero ($p=0,025$) e idade ($p<0,001$), mas não em relação ao número de eritrócitos entre gênero e idade ($p=0,137$). Observando os estudos de River (1999) verifica-se que ele obteve valores máximos e mínimos de $7.6 \times 10^6/\text{mm}^3$ e $7.2 \times 10^6/\text{mm}^3$, para machos, enquanto para fêmeas foram de $5.61 \times 10^6/\text{mm}^3$ e $5.41 \times 10^6/\text{mm}^3$. Ponte (2003) cita valores de $5.7 \pm 0.1 \times 10^6/\text{mm}^3$ e $5.1 \pm 0.1 \times 10^6/\text{mm}^3$ para machos e fêmeas respectivamente; Verçosa Júnior et al. (2004) citam valores de $7.23 \pm 1.74 \times 10^6/\text{mm}^3$ para fêmeas. Outros valores de eritrócitos citados para camundongos machos foram: Moreira (2007), $7.93 \pm 0.14 \times 10^6/\text{mm}^3$; Vasconcelos et al. (2007), $8.66 \pm 0.36 \times 10^6/\text{mm}^3$; Rodrigues (2010), $8.5 \pm 0.34 \times 10^6/\text{mm}^3$ e Xavier (2011), $8.46 \pm 0.10 \times 10^6/\text{mm}^3$.

Esta pesquisa obteve valores das hemácias semelhantes aos demais autores citados, pois o sangue dos animais experimentais apresentaram $9.80 \pm 0.46 \times 10^6/\mu\text{L}$ para valores máximos e $7.94 \pm 0.42 \times 10^6/\mu\text{L}$ como mínimo entre os gêneros. A idade de 90 dias foi maior que 30 e 45 dias, mas 75 e 105 dias foram maiores que com 30 dias. O número de glóbulos vermelhos foi maior nas fêmeas que nos machos.

Na tabela 3 estão descritas as médias e os desvios padrões dos parâmetros eritrocitários: Hm: hemácias. Hb: hemoglobina. Ht: hematócrito. VCM: Volume corpuscular médio. HCM: hemácia corpuscular média. CHCM: Concentração de Hemoglobina corpuscular média. Plaq: Plaquetas. RDW-SD: Largura de distribuição de hemácias/desvio padrão. RDW-CV: Largura de distribuição de hemácias/volume corpuscular. VPM: Volume médio das plaquetas.

A tabela 3 mostra os valores obtidos no eritrograma dos camundongos SWISS, machos e fêmeas em diferentes idades, do Biotério Central-UT/CCBS/UFMS.

Tabela 3 – Valores médios e desvio padrão obtidos no eritrograma de camundongos jovens e adultos, machos e fêmeas, da linhagem SWISS.

Variável Eritrograma	Idade dos animais (dias)						
	30	45	60	75	90	105	120
Hm(x10⁶/μL)							
Fêmeas	8,24±0,97	8,66±0,34	8,73±1,04	9,21±0,39	9,72±0,36	9,79±0,32	9,80±0,46
Machos	7,94±0,42	8,47±0,44	9,07±0,34	9,03±0,18	9,51±0,63	9,03±0,28	8,28±2,73
Hb(g/dL)							
Fêmeas	13,59±1,28	13,83±0,48	13,65±1,69	14,24±0,61	15,17±0,60	15,13±0,49	15,30±0,77
Machos	13,25±0,65	13,41±0,66	14,10±0,46	13,91±0,58	14,68±0,75	13,71±0,51	12,90±4,29
Ht (%)							
Fêmeas	48,56±2,55	45,53±1,83	45,10±5,04	48,80±1,82	51,86±2,78	50,67±2,04	52,06±2,32
Machos	47,28±3,79	45,19±2,08	45,89±1,79	46,73±1,01	48,94±3,40	46,76±1,33	45,59±14,90
VCM(fL)							
Fêmeas	59,50±6,49	52,59±1,95	51,69±1,17	53,01±0,76	53,37±2,08	51,83±1,01	53,16±1,82
Machos	59,56±4,31	53,34±1,39	50,61±2,28	51,76±0,59	51,46±1,78	51,49±1,12	55,05±2,67
HCM(pg)							
Fêmeas	16,54±0,71	15,97±0,38	15,63±0,31	15,46±0,08	15,61±0,39	15,49±0,51	15,63±0,39
Machos	16,71±1,23	15,84±0,21	15,55±0,33	15,41±0,45	15,46±0,45	15,09±0,25	15,56±0,19
CHCM(%L)							
Fêmeas	28,00±2,27	30,37±0,54	30,21±0,88	29,20±0,43	29,27±0,80	29,89±1,11	29,38±0,79
Machos	28,23±2,98	29,69±0,67	30,74±0,91	29,77±1,04	30,05±1,06	29,33±0,77	28,29±1,34
Plaq(10³/μL)							
Fêmeas	559,57± 277,90	467,14± 163,41	561,30± 363,47	765,71± 181,82	503,50± 151,12	427,86± 231,50	607,88± 165,10
Machos	631,50± 230,88	535,43± 98,19	613,31± 145,59	602,57±217,90	659,63± 168,76	486,43± 166,59	458,63± 241,63
RDW-SD (fL)							
Fêmeas	36,13±9,53	25,59±1,47	26,73±2,55	29,77±2,56	26,87±2,12	25,96±1,44	27,01±2,00
Machos	36,36±8,10	24,64±0,96	24,43±3,50	26,83±0,87	25,26±1,36	25,96±0,80	30,31±4,56
RDW-CV(fL)							
Fêmeas	18,59±1,95	16,10±1,56	17,14±1,34	19,06±1,04	17,41±0,57	17,50±0,95	17,60±0,94
Machos	18,33±2,49	14,46±0,77	16,71±1,17	17,50±0,75	17,20±0,69	16,90±0,33	17,59±1,19
VPM (fL)							
Fêmeas	8,07±0,78	7,30±0,26	7,66±0,52	7,91±0,34	7,35±0,41	7,10±0,70	7,39±0,17
Machos	7,71±0,53	7,11±0,11	7,43±0,18	7,39±0,42	7,24±0,31	7,03±0,19	7,23±0,41

5.4.2 Hemoglobina

Ao observar os valores para hemoglobina, houve diferença estatística em relação ao gênero ($p=0,012$) e a idade ($p=0,070$), mas não entre gênero e idade ($p=0,127$). River (1999) e Ponte (2003) relataram valores para machos de 14.44 g/dL e 11.2 g/dL e de 17.4 ± 0.9 g/dL, respectivamente, e para as fêmeas de 14.8 g/dL e 13.4 g/dL e de 15.0 ± 0.9 g/dL, respectivamente. Alguns autores só relataram valores para machos, como: Moreira, (2007) com valor de 10.96 ± 0.30 g/dL, Vasconcelos *et al.* (2007) que obtiveram o valor de 13.36 ± 1.10 g/dL e Rodrigues (2010) com valor de 13.2 ± 0.80 g/dL. Outros só citaram valores de hemoglobina de fêmeas, como: Verçosa Júnior *et al.* (2004) com 10.7 ± 2.55 g/dL e Melo *et al.* (2008) com 17.78 g/dL. Reis *et al.* (2000) e Xavier (2011), por sua vez, só relataram valores $12,1 \pm 0,6$ g/dL e de 14.37 ± 0.12 g/dL, respectivamente, mas não relataram o gênero.

Os dados acima citados comprovam que todos apresentaram semelhança com o presente trabalho, pois apresentou os valores máximo e mínimo de 15.30 ± 0.77 e 12.90 ± 4.29 g/dL para fêmeas e machos, respectivamente. No entanto, difere de Ponte (2003) e Melo *et al.* (2008).

Na comparação entre idades, não houve diferença significativa entre as idades, e entre gêneros, as fêmeas apresentaram valor de hemoglobina maior que os machos.

5.4.3 Hematócrito

Os valores para o hematócrito apresentaram diferença significativa em relação ao gênero ($p=0,015$) e a idade ($p=0,040$). Mas não foi diferente entre gênero e idade ($p=0,435$). Tendo como parâmetro os autores que servem de referência a este trabalho, os seguintes valores foram citados: River (1999) e Ponte (2003) citam para machos valores de 40% e 44% e $52.8 \pm 1.3\%$, respectivamente e, para fêmeas valores de $44.4 \pm 1.1\%$ e 39% e 43%, respectivamente. Alguns autores citam apenas os valores para machos, como Moreira (2007) com $41.86 \pm 0.76\%$ e Vasconcelos *et al.* (2007) com $40.76 \pm 1.35\%$. Outros citam apenas valores para

fêmeas, como Verçosa Júnior *et al.* (2004) com $30.86 \pm 7.78\%$, Melo *et al.* (2008), com 47.7% e Rodrigues (2010) com $40.1 \pm 1.2\%$ e Xavier (2011) com $47.55 \pm 0.61\%$. Reis *et al.* (2000), por sua vez, relatam valores de $42.7 \pm 1.7\%$, mas não relacionam ao gênero.

Após a coleta dos dados deste trabalho, os valores mínimos e máximos, para o hematócrito foram de $45.10 \pm 5.0\%$ e $48.84 \pm 3.4\%$. Houve diferença entre os resultados de Verçosa Júnior *et al.* (2004) e Ponte (2003), mas foi semelhante aos outros autores citados. Para os valores do hematócrito, entre as idades, não houve diferença significativa. Na comparação entre gêneros, as fêmeas apresentaram valores maiores que os machos.

5.4.4 Volume Corpuscular Médio

Este parâmetro não mostrou diferença estatística em relação ao gênero ($p=0,587$), e entre gênero e idade ($p=0,400$) mas mostrou diferença em relação a idade ($p<0,001$). Como parâmetro comparativo, têm-se os valores apresentados por: River (1999) com 77 fL e 83 fL para machos e 76 fL e 73 fL para fêmeas e Ponte (2003) com 93.4 ± 1.2 para machos e 87.7 ± 1.1 fL para fêmeas. Além desses, Melo *et al.* (2008) e Verçosa Júnior *et al.* (2004) citam valores apenas para fêmeas (49.2 fL e 42.57 ± 1.13 fL, respectivamente). Já Moreira (2007) e Vasconcelos *et al.* (2007) fazem referência apenas a valores de machos (52.81 ± 0.88 fL e $48.60 \pm 1.32\mu^3$, respectivamente). Já Reis *et al.* (2000) relatam valores de 83.8 ± 3.7 fL, Rodrigues (2010) de $48.5 \pm 1.3 \mu^3$ e Xavier (2011) de 56.22 ± 0.20 fL, mas não relacionam o gênero.

Os valores que a presente pesquisa obteve variaram de 59.56 ± 4.3 e 50.61 ± 2.2 fL em machos e 59.50 ± 6.4 e 51.69 ± 1.1 fL em fêmeas, ambos os gêneros são semelhantes, mas diferem para menos dos valores apresentados por River, (1999), Reis *et al.* (2000) e Ponte, (2003), e para mais de Verçosa Júnior *et al.* (2004) e Vasconcelos *et al.* (2007). Os valores do VCM, aos 30 dias foram maiores que aos 45, 60, 75, 90, 105 e 120 dias, e para 120 dias foram maiores que 60 dias de idade. Para os valores entre gêneros não houve diferença significativa.

5.4.5 Hemoglobina Corpuscular Média

A HCM não apresentou diferença significativa em relação ao gênero ($p=0,306$) e entre gênero e idade ($p=0,867$), mas apresentou diferença em relação a idade ($p<0,001$). Comprova-se essa diferença ao observar os valores que River (1999) apresentou para machos (27 pg e 29 pg) e fêmeas (26 pg e 25 pg). Melo *et al.* (2008) obtiveram valores de 16.32 pg para fêmeas, enquanto Verçosa Júnior *et al.* (2004), obtiveram 15 ± 1 pg.

Moreira (2007), Vasconcelos *et al.* (2007) e Rodrigues (2010), citam apenas valores para machos (13.81 ± 0.29 pg, 15.56 ± 0.51 μ g e 15.5 ± 0.5 μ g, respectivamente). Já Xavier (2011) e Reis *et al.* (2000) relatam valores de 17.27 ± 0.13 pg e 23.6 ± 1.2 pg, mas não especificam o gênero.

A hemoglobina corpuscular média (HCM), nos testes realizados para esta pesquisa, variou de 16.71 ± 1.2 pg e 15.46 ± 0.08 pg entre os machos, sendo que as fêmeas estão entre esses valores, diferindo de Pontes (2003), River (1999) e Reis *et al.* (2000). Comparando as idades, os valores para 30 dias foram maiores que 45, 60, 75, 90, 105 e 120 dias, e 45 dias foi maior que 105 dias, todavia, na comparação entre gêneros não houve diferença significativa.

5.4.6 Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

Com o mesmo teste observou-se para este parâmetro em relação ao gênero ($p=0,897$), e entre gênero e idade ($p=0,282$) que não houve diferença significativa. Já em relação a idade ($p<0,001$) houve diferença. Os valores comparativos obtidos por outros pesquisadores são: River (1999) que cita para machos o valor de 34 g/dL e para fêmeas 35 g/dL em diferentes idades e Ponte (2003) que relata o valor de $32.8 \pm 0.3\%$ para machos e $33.1 \pm 0.3\%$ para fêmeas. Além disso, há relatos apenas de valores para machos, como: Moreira (2007) com $26.15 \pm 0.30\%$, Vasconcelos *et al.* (2007) com $32.54 \pm 0.55\%$ e Rodrigues (2010) com $32.4 \pm 0.4\%$. Verçosa Júnior *et al.* (2004) e Melo *et al.* (2008) relatam apenas valores de CHCM para fêmeas

($34.57 \pm 2.57\%$ e 33.02 g/dL , respectivamente). Xavier (2011) e Reis *et al.* (2000), citam valores de $29.42 \pm 0.09 \text{ g/dL}$ e $28.3 \pm 0.8\%$, respectivamente, mas não citam o gênero.

De acordo com os resultados, o CHCM variou de 28.00 ± 2.27 a $30.74 \pm 0.91 \text{ g/dL}$ concordando com Reis *et al.* (2000), Moreira (2007) e Xavier (2011) que apresentaram os menores valores para CHCM do que os outros autores. Porém, na comparação entre idades, 60 dias foi maior que 30 e 120 dias; 45 90 e 105 dias foram maiores que 30 dias. Não houve diferenças significativas entre os machos e fêmeas na comparação entre gêneros.

5.4.7 Plaquetas

As plaquetas (Fig. 15 a e b) não apresentaram diferença estatística para o gênero ($p=0,745$) e idade ($p=0,136$) e entre gênero e idade ($p=0,293$). Comparando com os autores referenciados, River (1999) apresentou valores de $12 \times 10^5/\text{mm}^3$ para machos e para fêmeas; Ponte (2003) relata valores de $243.8 \pm 34.1/\text{mm}^3$ e $301.6 \pm 30.5/\text{mm}^3$ ($301.600/\mu\text{L}$) para machos e fêmeas, respectivamente; Vasconcelos *et al.* (2007) de $254.00 \pm 17.20 \times 10^3/\text{mm}^3$ ($254.000/\mu\text{L}$), para machos e Melo *et al.* (2008) de $487.600/\mu\text{L}$ para fêmeas. Já Rodrigues (2010) e Reis *et al.* (2000) citam valores de $261 \pm 18 \times 10^3/\text{mm}^3$ ($261.000/\mu\text{L}$) e $618.300 \pm 35.700/\mu\text{L}$, respectivamente, sem citar o gênero.

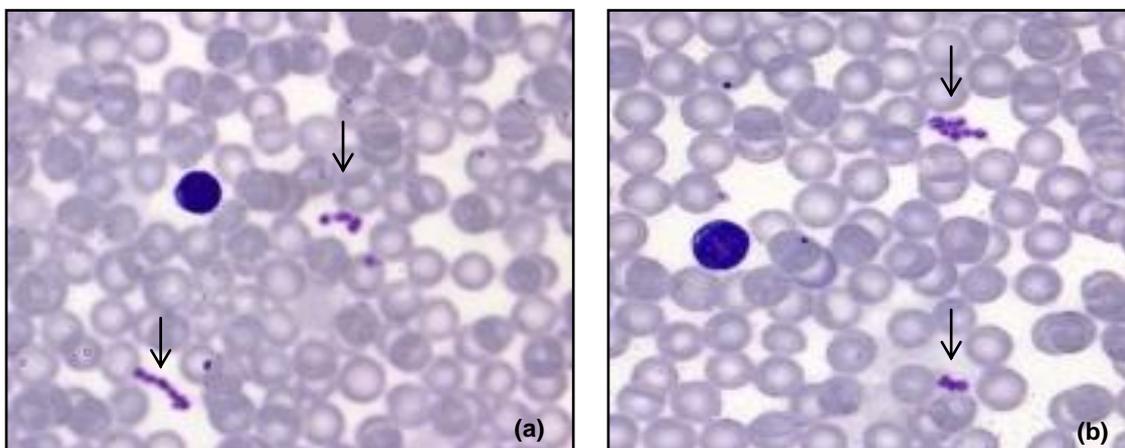


Figura 15. Plaquetas nos esfregaços sanguíneos de camundongos macho (a) e fêmea (b), da linhagem SWISS. Corado com Panótico. Objetiva de imersão.

No presente trabalho foram observados valores mínimos e máximos de 427.86 ± 231.50 ($427.860/\mu\text{L}$) a 765.71 ± 181.82 $10^3/\mu\text{L}$ ($765.710/\mu\text{L}$), considerando machos e fêmeas. Não houve diferença significativa em relação aos autores referências, diferente de Vasconcelos *et al.* (2007) e Ponte (2003) que obtiveram menores valores.

5.4.8 Largura da Distribuição de Hemácias relacionada ao desvio padrão

O RDW-SD não apresentou diferença significativa em relação ao gênero ($p=0,422$) e entre gênero e idade ($p=0,364$), contudo em relação à idade ($p<0,001$) apresentou diferença. Importante salientar que Monteiro (2010) reporta que juntos, os parâmetros RDW e o VCM podem auxiliar no diagnóstico diferencial de diversas enfermidades, em especial alguns tipos de anemias, e com maior relação com o VCM macrocítico, como os animais apresentavam-se sadios, esses valores estão dentro da normalidade. Na comparação entre idades, os valores de RDW-SD foram maiores aos 30 dias que aos 45, 60, 75, 90, 105 e 120 dias e comparando os gêneros não houve diferença significativa. Não houve informação de outros autores em linhagem SWISS.

5.4.9 Largura da Distribuição de Hemácias Relacionada ao Volume Corpuscular

No RDW-CV, em relação ao gênero ($p=0,006$) e a idade ($p<0,001$) apresentou diferença estatística, mas não apresentou diferença entre gênero e idade ($p=0,415$). Apesar de não haver informação de outros autores em animais, Monteiro (2010) reporta para humanos que os estudos de correlação mostram que o RDW-CV tem alta relação com o VCM microcítico. Esta pesquisa mostrou que os valores no RDW-CV entre idades, aos 30 e 75 dias foram maiores que nas idades de 45 e 60 dias; e 60, 90, 105 e para 120 dias foi maior que 45 dias. Comparando os gêneros, as fêmeas apresentaram valores maiores que os machos, mas sem apresentarem anemia.

5.4.10 Volume Médio de Plaquetas (VPM)

O VPM apresentou valores em relação ao gênero ($p=0,005$), e idade ($p<0,001$) com diferença estatística, mas a interação entre gênero e idade ($p=0,798$) sem diferença estatística. Os valores do VPM foram maiores aos 30 dias do que aos 45, 90, 105 e 120 dias e, 60 e 75 dias maiores do que 105 dias, e maiores nas fêmeas, mesmo não havendo referências em animais. Para Faria, Dal Bó (2010) a avaliação do tamanho e da morfologia das plaquetas torna-se útil no diagnóstico de pacientes com desordens plaquetárias, por isso o VPM é de grande importância, particularmente nas trombocitopenias e trombocitoses.

A presença de policromasia (Figura 16 a e b) foi observada no presente trabalho. Sanderson, Phillips (1981) descrevem que o camundongo tem contagem maior de reticulócitos (3 a 4%) que o homem ao longo de toda sua vida. Em consequência disso, ocorre no esfregaço sanguíneo, a presença de policromasia, e uma contagem alta de reticulócitos chegando a 7% em camundongos jovens. Isso foi observado nos animais com 30 a 45 dias, nos quais as quantidades de células jovens por campo apresentaram-se em maior número do que os animais com mais idade, estando menos evidentes.

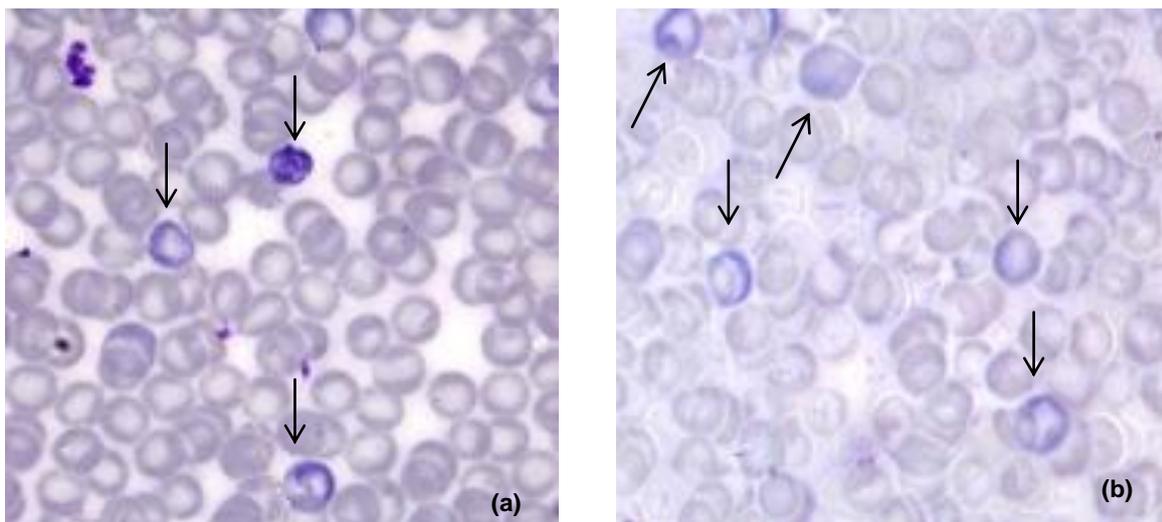


Figura 16. Policromasia nos esfregaços sanguíneos de camundongo jovem (a) e adulto(b), da linhagem Swiss. Corado com Panótico. Objetiva de imersão.

5.5 Parâmetros Bioquímicos Séricos

A tabela abaixo mostra os valores obtidos neste trabalho nas análises bioquímicas do soro dos camundongos SWISS, machos e fêmeas em diferentes idades. Na tabela 4 estão descritas as médias e os desvios padrões dos analitos séricos.

Tabela 4 – Valores médios e desvio padrão da análise bioquímica do soro de camundongos jovens e adultos, machos e fêmeas, da linhagem SWISS.

Variável Bioq.	Idade dos animais (dias)						
	30	45	60	75	90	105	120
Alb.(g/dL)							
Fêmeas	3,19±0,33	3,30±0,14	3,39±0,23	2,98±0,32	3,37±0,22	3,31±0,22	3,26±0,29
Machos	2,85±0,15	3,40±0,16	3,39±0,72	3,27±0,48	2,89±0,22	2,66±0,16	3,27±0,35
PT(g/dL)							
Fêmeas	4,52±0,47	4,49±0,43	5,33±0,35	3,95±0,43	4,91±0,50	4,58±0,25	4,56±0,47
Machos	4,20±0,35	4,84±0,63	5,06±0,78	4,89±1,06	4,26±0,67	3,86±0,26	4,69±0,52
ALT(U/L)							
Fêmeas	32,49±7,55	26,29±11,15	29,86±4,95	29,81±5,45	35,50±18,42	36,25±22,71	36,83±12,98
Machos	22,63±7,31	24,33±5,21	34,69±9,21	52,00±28,59	33,66±4,94	33,94±12,16	49,73±50,63
Col(mg/dL)							
Fêmeas	97,98±8,44	83,34±4,49	116,33±14,09	76,95±9,53	89,30±15,15	91,09±10,46	81,00±14,16
Machos	90,34±17,28	113,60±9,62	128,22±23,53	138,33±37,73	102,66±11,18	93,67±10,51	94,71±13,11
Crea(mg/dL)							
Fêmeas	0,20±0,00	0,20±0,00	0,20±0,00	0,20±0,00	0,26±0,08	0,29±0,10	0,21±0,04
Machos	0,20±0,00	0,20±0,00	0,22±0,06	0,27±0,08	0,21±0,04	0,21±0,04	0,20±0,00
Trig(mg/dL)							
Fêmeas	253,31±29,99	196,93±10,22	273,67±37,12	204,26±50,09	270,75±30,52	290,24±70,70	236,29±52,27
Machos	222,43±43,10	246,57±67,84	344,83±133,11	255,07±46,07	205,54±90,59	169,74±60,35	209,20±28,79
A:G.							
Fêmeas	2,98±0,28	3,38±0,17	-	3,16±0,26	2,93±0,39	2,68±0,57	2,51±0,35
Machos	2,38±0,33	2,87±0,31	2,55±0,44	2,53±0,17	2,39±0,25	2,43±0,13	2,40±0,44
VLDL(mg/dL)							
Fêmeas	46,44±1,49	38,88±1,80	-	40,88±10,03	55,51±6,82	58,07±14,14	48,80±10,07
Machos	52,15±2,83	72,23±4,90	95,88±26,44	48,13±11,16	38,97±18,44	32,17±10,02	43,56±8,33
Glob(g/dL)							
Fêmeas	1,08±0,04	0,95±0,06	-	1,03±0,18	1,16±0,24	1,25±0,20	1,41±0,18
Machos	1,20±0,22	1,10±0,00	1,73±0,33	1,18±0,10	1,20±0,16	1,14±0,10	1,39±0,27

5.5.1 Albumina

Os valores séricos da albumina mostraram diferença significativa em relação ao gênero ($p=0,020$), idade ($p=0,003$) e entre gênero e idade. Os valores obtidos no presente trabalho são semelhantes aos valores dos camundongos SWISS machos analisados por River (1999), com albumina de 2.4 g/dL e 2.8 g/dL, valores menores e maiores, respectivamente. O mesmo autor encontrou no soro das fêmeas os valores maiores e menores de Albumina de 3.0 g/dL e 3.3 g/dL. Spinelli *et al.* (2012) cita valores de 2.48 ± 1.72 g/dL e 2.42 ± 6.85 g/dL, para machos e fêmeas respectivamente. Na pesquisa aqui apresentada, os valores mínimos e máximos para Albumina no macho foram de 2.66 ± 0.16 e 3.40 ± 0.16 g/dL, respectivamente, estando a fêmea dentro desses valores e semelhantes aos outros autores.

Todavia, os valores obtidos com Albumina, na comparação dos machos, as idades de 45 e 60 dias foram maiores que 30 e 105 dias e, 75 e 120 dias maiores que 105 dias. Já em relação à comparação entre idades nas fêmeas, não houve diferença significativa. Em comparação entre gêneros, nas idades 30, 90 e 105 dias as fêmeas apresentaram valores maiores que nos machos. Na comparação entre gêneros nas idades 45, 60, 75 e 120 dias, não houve diferença significativa.

5.5.2 Globulina

No teste utilizado neste trabalho, os valores para globulina em relação ao gênero ($p=0,380$) e entre gênero e idade ($p=0,162$) não teve valor significativo, mas o efeito da idade ($p<0,001$) apresentou valores com diferença significativa. Em pesquisas anteriores, River (1999) obteve valores de 1.7 g/dL a 2.4 g/dL para machos e 1.4 g/dL e 2.4 g/dL para fêmeas, de diferentes idades. Os valores apresentados por Spinelli *et al.* (2012) foram de 5.242 ± 7.43 g/dL para machos e 2.338 ± 6.34 g/dL para fêmeas. Moreira (2007), por sua vez, sem citar o gênero, apresenta valor de 1.34 ± 0.13 g/dL.

Como se percebe, em relação à globulina, todos estão com valores maiores que os obtidos no presente trabalho, o qual chegou com valores mínimos e máximos de 0.95 ± 0.06 g/dL e 1.41 ± 0.18 g/dL, para fêmeas e 1.10 ± 0.00 g/dL e 1.73 ± 1.33 g/dL, para machos. Na comparação entre idades, os valores obtidos para os animais com 120 dias foram maiores que com 30, 45, 75, 90 e 105 dias. Já na comparação entre gêneros, não houve diferença significativa.

5.5.3 Relação Albumina:Globulina

A relação albumina:globulina, quanto ao gênero ($p < 0,001$) e o efeito da idade ($p = 0,003$), apresentaram diferença significativa. Na interação entre gênero e idade ($p = 0,355$) os valores não foram diferentes. Observando River (1999) verifica-se que ele encontrou para A:G. valores de 1.6 e 1.12 para machos e 1.33 e 1.25 para fêmeas. No estudo desenvolvido no Biotério da UFMS, os valores obtidos da relação A:G foram de 2.51 ± 0.35 e 3.38 ± 0.17 para fêmeas; e de 2.38 ± 0.33 e 2.87 ± 0.31 para os machos. Todos esses valores são maiores em ambos os gêneros e todas as idades que os obtidos por River (1999). Na comparação entre idades, os valores aos 45 dias foram maiores que aos 105 e 120 dias e, na comparação entre gêneros, as fêmeas tiveram valores maiores que os machos.

5.5.4 Proteínas Totais

As proteínas totais não apresentaram diferença para o gênero ($p = 0,464$), mas foram diferentes para a idade ($p < 0,001$) e para a interação entre gênero e idade ($p < 0,001$). Esses resultados corroboram com os trabalhos de River (1999) que obteve para machos proteína total de 4.3 g/dL e 5.2 g/dL e para fêmeas de 4.7 e 5.6 g/dL em diferentes idades. Moreira (2007) cita o valor de 4.28 ± 0.17 g/dL; Melo *et al.* (2008) citam 5.2g/dL, enquanto que Spinelli *et al.* (2012) citam 4.458 ± 0.62 g/dL e Rodrigues (2010) o valor de 6.5 ± 0.5 g/dL.

A quantificação dos valores das proteínas totais encontradas foi no soro, portanto são menores, visto que não há presença de fibrinogênio. Obtiveram-se valores de 5.33 ± 0.35 g/dL e 3.86 ± 0.26 g/dL nos machos e fêmeas, respectivamente. Mesmo assim, corroboram com os valores apresentados no trabalho de River (1999), Spinelli *et al.* (2012) e Moreira (2007). Na comparação entre idades, nos machos, os valores com idade de 60 dias foram maiores que aos 30, 90 e 105 dias; e as idades de 45 e 75, maiores que 105 dias. Na comparação entre idades das fêmeas de 60 e 90 dias, os valores foram maiores que com 75 dias. Entre gêneros, nas idades 90 e 105 dias os valores obtidos para as fêmeas foram maiores que para os machos. Entre gêneros, na idade de 75 dias, os valores obtidos para machos foram maiores que nas fêmeas. Já entre gêneros, não houve diferença significativa aos 30, 45, 60 e 120 dias de idade.

5.5.5 Alanina Aminotransferase

Fazendo a interpretação dos dados obtidos, percebe-se que o ALT apresentou valores em relação ao gênero ($p=0,330$), a idade ($p=0,095$), a interação entre gênero e idade ($p=0,239$), demonstrando que não houve diferença nos valores da atividade sérica da enzima alanina aminotransferase entre as idades e o gênero de animais saudáveis. O parâmetro existente de River, (1999) contém valores mínimos e máximos para ALT de 84 UI/L e 118 UI/L para machos e de 101 UI/L e 106 UI/L para fêmeas, sendo valores diferentes dos obtidos no presente trabalho e também dos trabalhos de Moreira (2007) com 45.00 ± 3.07 U/L, Melo *et al.* (2008) com 43.2 UI/L, Silva (2009) com 74.70 ± 10.40 U/L, Rodrigues (2010) com 54.2 ± 3.2 U/L e Spinelli *et al.* (2012) com 23.60 ± 4.80 U/L (machos) e 24.20 ± 9.16 U/L (fêmeas). No presente trabalho, obteve-se para as médias de ALT os valores mínimos e máximos de 26.29 ± 11.15 U/L e 32.49 ± 7.55 U/L (fêmeas) e de 22.63 ± 7.31 U/L e 52.00 ± 28.59 U/L (machos), havendo semelhança entre as idades e o gênero e diferindo de River (1999) e Silva (2009).

5.5.6 Colesterol

O colesterol no teste aplicado apresentou resultados diferentes estatisticamente em relação ao gênero ($p < 0,001$), idade ($p < 0,001$) e em relação a interação entre gênero e idade ($p < 0,001$). Observa-se no trabalho de River, (1999) em relação à idade, valores para colesterol de 61 mg/dL e 85 mg/dL, em machos de diferentes idades. Em relação às fêmeas, River, (1999) obteve colesterol com valores de 59 mg/dL e 72 mg/dL, em idade de 6 a 34 semanas; Silva (2009) por sua vez, obteve valor de 134.70 ± 9.50 mg/dL; Rodrigues (2010) de 82.1 ± 2.2 mg/dL; Spinelli *et al.* (2012) de 140.00 ± 26.05 mg/dL (machos) e 99.80 ± 8.88 mg/dL (fêmeas).

Na presente pesquisa, o valor mínimo do colesterol das fêmeas foi de 76.95 ± 9.53 mg/dL e o máximo de 116.33 ± 14.09 mg/dL; para os machos o mínimo de 90.34 ± 17.28 mg/dL e o máximo de 138.33 ± 37.73 mg/dL, diferindo de River (1999). Na comparação entre idades, nos machos os valores foram maiores nas idades 60 e 75 que aos 30, 90, 105 e 120 dias. Na comparação entre fêmeas, os valores nas idades de 60 foram maiores que os de 45, 75, 90, 105 e 120 dias. Na comparação entre gêneros, os valores nas idades de 45 e 75 dias os machos foram maiores que nas fêmeas. Entre gêneros, os resultados nas idades de 30, 60, 90, 105 e 120 dias não apresentaram diferença significativa.

5.5.7 Creatinina

Os valores obtidos para a creatinina considerando o gênero ($p = 0,501$) não houve diferença estatística. Quanto à idade ($p = 0,018$) e à interação entre gênero e idade ($p = 0,004$), os valores apresentaram diferença significativa concordando com River, (1999) que observou valores mínimos e máximo para creatinina de 0.5 mg/dL e 0.7 mg/dL, em diferentes idades nos machos e nas fêmeas valores de 0.5 mg/dL e 0.6 mg/dL, em diferentes idades e não diferem entre si. Já Moreira (2007) obteve para creatinina o valor de 0.32 ± 0.02 mg/dL, Rodrigues (2010), de 0.39 ± 0.04

mg/dL e Spinelli *et al.* (2012) de 0.28 ± 0.15 mg/dL (machos) e 0.14 ± 0.04 mg/dL (fêmeas).

Na pesquisa realizada no Biotério Central-UT/CCBS da UFMS, os valores mínimos e máximos para machos foram de 0.20 ± 0.00 mg/dL e 0.27 ± 0.08 mg/dL e para fêmeas de 0.20 ± 0.00 mg/dL e 0.29 ± 0.10 mg/dL, sendo valores semelhantes a Spinelli *et al.* (2012). Os resultados entre idades nos machos não apresentou diferença significativa, e na comparação entre idades nas fêmeas os valores na idade de 105 foram maiores que 30, 45, 60, 75, e 120 dias; e na comparação entre gêneros na idade de 75 dias, os valores para machos foram maiores que para fêmeas. Na comparação entre gêneros na idade 105 dias, os valores para fêmeas foram maiores. Na comparação entre gêneros nas idades 30, 45, 60, 90 e 120 dias não houve diferença significativa.

5.5.8 Triglicérides

Os valores bioquímicos para triglicérides, comparando o gênero ($p=0,406$) observa-se que não houve diferença significativa, mas houve diferença em relação à idade ($p=0,004$) e interação entre gênero e idade ($p<0,001$). Moreira (2007) obteve os seguintes valores para Trig: 136.08 ± 30.62 mg/dL. Rodrigues (2010) cita valores de 109 ± 5.4 mg/dL; e Spinelli *et al.* (2012) encontraram os seguintes valores para triglicérides: 79.60 ± 33.30 mg/dL (machos) e 95.00 ± 14.56 mg/dL (fêmeas). Os resultados obtidos (mínimo e máximo), no presente trabalho foram: para fêmeas - 196.93 ± 10.2 mg/dL e 290.24 ± 70.70 mg/dL e para machos - 169.74 ± 60.35 mg/dL e 344.83 ± 133.11 mg/dL, diferindo de todos os outros autores que apresentaram valores menores. Em relação à comparação entre idades nos machos, os valores de triglicérides obtidos na idade de 60 dias foram maiores que aos 30, 45, 90, 105 e 120 dias.

Na comparação entre idades, nas fêmeas não houve diferença significativa e na comparação entre gêneros na idade 60 dias os valores do analito foram maiores em machos do que em fêmeas. Comparando os gêneros, nas idades 90 e 105 dias, os valores para fêmeas foram maiores que para os machos. Na comparação entre gêneros nas idades 30, 45, 75 e 120 dias, não houve diferença significativa.

5.5.9 Lipoproteína de Muito Baixa Densidade

O VLDL em relação ao gênero dos animais ($p=0,932$) e a idade ($p=0,319$) não apresentou diferença significativa. Spinelli *et al.* (2012) obtiveram valores para machos SWISS de 15.92 ± 15.92 mg/dL e para fêmeas de 19.00 ± 2.91 mg/dL.

Este trabalho apresentou valores mínimos e máximos para VLDL de 38.88 ± 1.80 mg/dL e 58.07 ± 14.14 mg/dL para fêmeas e 32.17 ± 10.02 mg/dL e 95.88 ± 2.644 mg/dL, para machos. Apesar de não apresentarem diferença entre gênero, apresentaram diferença para os demais autores. Os valores entre gênero e idade ($p<0,001$) foram significativos. Entre as idades, nos machos foram maiores aos 45 dias que aos 75, 90, 105 e 120 dias e aos 30 dias foram maiores que aos 105 dias. Na comparação entre idades, nas fêmeas com 105 dias foram maiores que aos 45 e 75 dias. Entre gêneros, na idade 45 dias, os valores nos machos foram maiores que nas fêmeas. Entre gêneros, nas idades de 90 e 105 dias, os valores obtidos para as fêmeas foram maiores que nos machos. Já nas idades de 30, 75 e 120 dias, não houve diferença significativa dos gêneros.

6 CONCLUSÕES

- a. A avaliação ponderal mostrou diferença significativa em relação ao gênero, idade ao longo do tempo e entre gênero e idade de 30, 45, 60, 75, 90, 105 e 120 dos camundongos,
- b. O perfil leucocitário mostrou diferença entre machos e fêmeas no número de leucócitos totais, que foi maior nas idades de 30, 45, 75, 105 e 120 dias para as fêmeas. Para os neutrófilos os valores foram maiores nos machos aos 30, 45, 75, 90, 105 e 120 dias. Em relação aos monócitos, foram maiores nos machos nas idades de 60, 75, 90, 105 e 120 dias. Os valores para linfócitos foram maiores nas fêmeas nas idades de 30, 45, 75, 90, 105 e 120 dias. Os eosinófilos e basófilos não apresentaram diferença estatística. As fêmeas apresentaram valores mais homogêneos.
- c. O perfil eritrocitário mostrou diferença entre machos e fêmeas nos valores das hemácias aos 30, 45, 75, 90, 105 e 120 dias foram maiores nas fêmeas. Quanto a hemoglobina e o hematócrito das fêmeas, os valores foram maiores em todas as idades, menos com 60 dias. Os valores de VCM nas fêmeas foram maiores aos 45, 60, 75, 90 e 105 dias. Os valores de HCM foram maiores em todas as idades, com exceção dos 30 dias. Para o CHCM os valores nas idades de 45, 105, 120 foram maiores nas fêmeas. Para o RDW-SD os valores aos 45, 60, 75, 90 e 105 dias. Para o RDW-CV e ao VPM os valores foram maiores em todas as idades. Quanto ao número de plaquetas as idades de 75 e 120 dias foram maiores em fêmeas, mas não apresentaram diferença significativa entre os gêneros.
- d. Dentre os parâmetros bioquímicos séricos, os valores obtidos para as fêmeas foram maiores para albumina aos 30, 90, 105 dias. Para proteína sérica ao 30, 60, 90 e 105 dias forma maiores para as fêmeas. Para a atividade sérica da enzima alanina amino transferase foram maiores aos 30, 45, 90 e 105 dias para

as fêmeas. Em relação ao colesterol, os machos apresentaram valores maiores em todas as idades, menos aos 30 dias. Quanto aos valores para lipoproteína de muito baixa densidade aos 30 até 75 dias foram maiores nas fêmeas. Para a globulina, os valores obtidos para as fêmeas foram maiores em todas as idades, menos com 120 dias.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As diferenças ocorridas nos parâmetros quantificados, no sangue e soro, são em consequência da evolução etária dos animais, e ocorreram como fator fisiológico normal.

Os valores obtidos neste estudo servem como padrão referencial para os camundongos da linhagem SWISS do Biotério Central DA Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pois refletem a condição normal dos valores bioquímicos e hematológicos dessa colônia. Assim, poderão ser comparados a valores obtidos em diferentes ensaios a serem propostos, em condições experimentais.

Esse estudo fortalece a necessidade do estabelecimento de valores de referência para cada biotério / instituição, em razão das diferenças encontradas em animais com diferentes gêneros, idades e padrões sanitários.

8. REFERÊNCIAS

Almeida AS, Faleiros ACG, Teixeira DNS, Cota UA, Chica JEL. Valores de referência de parâmetros bioquímicos no sangue de duas linhagens de camundongos. *Journal Brasileiro de Patologia de Medicina Laboratorial*. Dec. 2008; Rio de Janeiro, 44(6): 429-432.

Andersen ML, Dalmeida V, Ko GM, Kawakami R, Martins PJF, De Magalhães LE, Princípios éticos e práticos do uso de animais de laboratório. São Paulo: UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo, 2004.

Andersen ML, Souza MC. Estresse e suas interferências. In: cuidados e manejo de animais de laboratório. São Paulo: Ateneu. p. 517-536, 2009.

Barcellos PS, Silva TA da, Chagas DC das, Nascimento FRF, Guerra RNM, Barroqueiro ESB. Avaliação bioquímica e toxicológica do extrato dos frutos de *Euterpe oleracea* Martius (Açaí). *Revista Ciências da Saúde*, v. 12, n. 2, p. 91-96, jul-dez, 2010.

Borjesson DL, Christopher MM, Boyce WM. Biochemical and hematologic reference intervals for free-ranging desert bighorn sheep. *J Wildl Dis*. 2000 Apr; 36(2): 294-300. PubMed. Disponível em: <http://www.jwildlifedis.org/content/36/2/294.long>. Acesso em: 03 mar. 2012.

Chorilli M, Michelin DC, Salgado, HRN Animais de laboratório: o camundongo. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, v. 28, n.1, p.11-23, 2007.

Damy SB, Camargo RS, Chammas R, Figueiredo LFP de. Aspectos fundamentais da experimentação animal – aplicações em cirurgia experimental. *Rev. Assoc Med Bras*. 2010; 56 (1): 103-11.

Doeing DC, Borowicz JL, Crockett ET. Gender dimorphism in differential peripheral blood leukocyte counts in mice using cardiac, tail, foot, and saphenous vein puncture methods. *Bio Med Central Clinical Pathology*. 2003; 3(3): 1-6.

Fagundes DJ, Taha MO. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. *Acta cirúrgica Brasileira*. 2004; 19(1): 69-65.

Farias MG, Dal Bó S. Importância clínica e laboratorial do volume plaquetário médio. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2010 Ago; 46(4): 275-281.

Fernández I, Peña A, Del Teso N, Pérez V, Rodriguez-Cuesta J. Biochemistry parameters in C57/BL/6J mice after blood collection from the submandibular vein and retroorbital plexus. *American Association for Laboratory Animal Science*. 2010 March; 49(2): 202–206.

Ferreira LM, Hochman B, Barbosa MVJ. Modelos experimentais em pesquisa. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2005; 20 (Supl. 2): 28-34.

González FHD, Carvalho V, Möller VA, Duarte FR. Perfil bioquímico sanguíneo de cães e gatos na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. *Arq Fac Vet UFRGS*. 2001; 29:1-6.

Guimarães PTC, Pinto MCL, Melo MM. Perfis clínico e hematológico de camundongos submetidos ao envenenamento escorpiônico experimental por *Tityus fasciolatus*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. Belo Horizonte, 2011; Dec; 63(6): 1382-1390.

Hoff J. Methods of blood collection in the mouse. *Lab Anim* 2000; 29(10): 47-53.

Kajioka EH, Andres ML, Nelson GA, Gridley DS. Immunologic variables in male and female C57BL/6 mice from two sources. *Comparative Medicine by the American Association for Laboratory Animal Science*. 2000 June; 50(3): 288-291.

Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. Clinical biochemistry of domestic animals. 6^o ed. London: Academics Press, 2008.

Kerr MG. Exames laboratoriais em medicina veterinária. Bioquímica clínica e hematologia. 2 ed. São Paulo: Roca, 2003.

Machado CML, Ikemori RY, Furuzawa KM, Aguiar R. Diretoria Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa Centro de Bioterismo da FMUSP. Centro de Bioterismo. Disponível em: http://www.biot.fm.usp.br/index.php?mpg=03.00.00&tipCAMUNDONGO&id_ani=9&uso=sim. Acesso em 18 set 2012.

Majerowicz, J. Boas Práticas em Biotérios e Biossegurança. Rio de Janeiro: Interciência; 2008.

Melo MM, Verçosa JrD, Pinto MCL, Silveira JB, Ferraz V, Ecco R, Paes PRO. Intoxicação experimental com extratos de *Mascagnia rigida* (Malpighiaceae) em camundongos. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. Belo Horizonte, 2008 June; 60(3): 631-640.

Monteiro L. Valores de referência do RDW-CV e do RDW-SD e sua relação com o VCM entre os pacientes atendidos no ambulatório do Hospital Universitário Oswaldo Cruz-Recife, PE. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. 2010 Jan/ Fev; 32(1): 34-39.

Monteiro R, Brandau R, Gomes WJ, Braille DM Tendências em experimentação animal, Revista Brasileira de Cirurgia Vascul. 2009, 24(4);506-513.

Moreira CQ. Toxicidade em camundongos devido à exposição prolongada a uma floração de cianobactérias contendo microcistinas: avaliações comportamental, hematológica, bioquímica e antomopatológica. [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2007.

Paiva FP, Maffili VV, Santos ACS. Organização: Curso de Manipulação de Animais de Laboratório. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, Salvador, BA. Maio, 2005.

Ponte FLR. Toxicidade pré-clínica de fitoterápicos à base de mel de abelha própolis e extratos de *Mikania glomerata*, *Eucalyptus globulus* ou da associação *Zingiber officinale* e *Allium sativum* em roedores. [Dissertação]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco-CCB. Departamento de Fisiologia e Farmacologia. 2003.

Reis CMF, Carvalho JCT, Caputo LRG, Patrício KCM, Barbosa MVJ, Chieff AL, Bastos JK. Atividade antiinflamatória, antiúlcera gástrica e toxicidade subcrônica do extrato etanólico de própolis. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2000; 9(10): 43-

Reis AS dos, Serra ICPB, Assunção AKM, Fialho SEM, Sousa SM, Ferreira LJC, Guerra RMN, Ribeiro MNS, Nascimento FRF do. Avaliação da toxicidade aguda do extrato hidroalcoólico de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith aplicado por via oral. *Anais...III Reunião Regional DA FESBE*. 29 de maio a 01 de junho de 2008.

River C. Laboratories International, Inc. 251 Ballardvale Street. Wilmington, MA 01887.1.781.222.6000. Tabela de valores sanguíneos, 1999. disponível em: www.criver.com, acesso em: 24 de março de 2012.

Rodrigues NC. Estudo toxicológico pré-agudo do extrato padronizado de Própolis Vermelha do Brasil. [Dissertação] São Paulo: Universidade Bandeirante de São Paulo. 2010.

Rogero MM, Borges MC, Pires IS de O, Tirapegui J. O desmame precoce afeta o ganho de peso e a composição corporal em camundongos adultos?. *Revista de Nutrição*. [online], vol.23, n.1, pp. 85-93, 2010,

Sanderson JH, Phillips CE. An atlas of laboratory animal haematology. Oxford: Clarendon Press. 1981.

Schneck K, Washington M, Holder D, Lodge K, Motzel S. Hematologic and serum biochemical reference values in nontransgenic FVB mice comparative medicine. *American Association for Laboratory Animal Science*. 2000 February; 50(1): 32-35.

Schanaider A, Silva PC. Uso de animais em cirurgia experimental. Acta Cirúrgica Brasileira. São Paulo 2004 July/Aug; 19(4): 441-447.

Schnell MA, Hardy C, Hawley M, Propert KJ, Wilson JM. Efeito da técnica de coleta de sangue em ratos sobre parâmetros clínicos de patologia. Human Gene Therapy. 2002 Jan; 13(1):155-61.

Silva AC, Muradas RF, Ferreira ÉG, Braga DK, Oliveira FM, Costa ASV da. Efeito da adição dietética de milho de alta qualidade protéica em camundongos. Revista de Nutrição. [online]. vol. 20, n.3, pp. 249-255 2007.

Silva RP. Efeito de extratos vegetais na parasitemia de *Trypanosoma cruzi* e na biodistribuição do Pertecnetato de Sódio ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$). [Dissertação]. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2009.

Silveira JM. Interpretação de resultados laboratoriais. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1988.

Smith, GS. Neutrophils. In: Feldeman B, Zinkl J, Jain NC. Schalm's veterinary hematology. 5^a ed. Philadelphia: Lippincott, Williams e Wilkins, 2000. Cap 46.

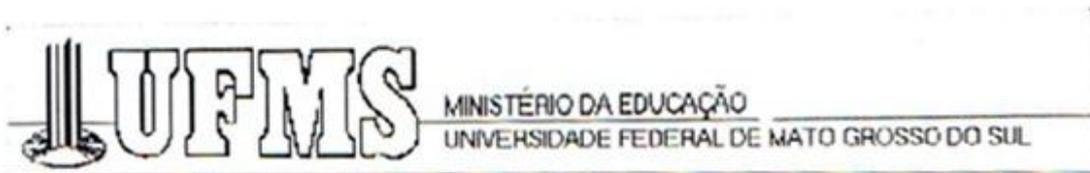
Souza MMC. Avaliação da atividade ovicida de *Annona Squamosa* Linnaeus, sobre nematóides *Haemunchus contortus* Rudolphi e toxicidade em camundongos. [Dissertação]. Ceará: Universidade Estadual do Ceará; 2003.

Spinelli MO, Cruz RJ, Godoy CMS, Junqueira MS, Motta MC, Bortolatto J. Perfil bioquímico dos animais de laboratório do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. RESBCAL Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório. São Paulo, 2012; jan/Fev/ Mar, 1(1): 76-81.

Thrall MA. Veterinary hematology and clinical chemistry. London: Lippincott W & Wilkins, 2004.

- Troiano JC, Gould EG, Gould I. Hematological reference intervals in argentine lizard *Tupinambis meriana* (Sauria-Teiidae). *Comp Clin Pathol*. 2008; 17: 93–7.
- Vasconcelos TH, Modesto-Filho J, Diniz MFFM, Santos HB, Aguiar FB, Moreira PVL. Estudo toxicológico pré-clínico agudo com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2007 Out/Dez; 17(4): 583-59.
- Verçosa Júnior D, Melo MM, Dantas-Barros AM, Gomes AM, Silva Júnior PG, Lago EP. Quadro hematológico e peso do baço de camundongos com tumor de Ehrlich na forma sólida tratados com *Agaricus blazei*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2004; 14(supl. 01): 32-34.
- Verçosa Júnior D, Souza-Fagundes EM, Cassali GD, Ribeiro EL, Zani CL, Melo MM. Efeito do miriadenolídeo isolado de *Alomia myriadenia* (Asteraceae) sobre o tumor de Ehrlich ascítico no camundongo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2006; 58: 788-798.
- Xavier AL. Estudo do potencial antitumoral de *Lippia microphylla* Cham (Verbenaceae) e sua toxicidade. [Dissertação]. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba; 2011.

ANEXO 1



C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 354 da Pesquisadora Iandara Schettert Silva, "**Parâmetros referenciais hematológicos e bioquímicos de camundongos (*Mus musculus*) linhagem Swiss**", está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião de 14 de outubro de 2011.

Campo Grande (MS), 20 de outubro de 2011.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Joice Stein', is positioned above the printed name.

Drª Joice Stein
Coordenadora da CEUA

ANEXO 2

ANEXO 2 - Valores mínimos e máximos para os parâmetros hematológicos de Camundongos da linhagem SWISS , machos e fêmeas de diferentes idades, provenientes do Biotério Central-UT/CCBS/UFMS

Parâmetros	Analitos	unidades	Idade																											
			30 dias				45 dias				60 dias				75 dias				90 dias				105 dias				120 dias			
			mín.		máx		mín.		máx		mín.		máx		mín.		máx		mín.		máx		mín.		máx		mín.		máx	
			♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Hematológicos	Hm	(x10 ⁶ /μL)	7.2	7.55	8.51	9.82	7.93	7.95	8.91	9.09	8.33	6.85	9.52	9.63	8.82	8.87	9.36	9.80	8.59	8.99	10.27	10.23	8.70	9.34	9.52	10.2	8.34	9.2	9.89	10.41
	Hb	(g/dL)	12.3	11.8	14.1	14.8	12.5	12.8	14.3	14.2	13.3	10.5	14.8	14.9	13	13.6	14.8	15.2	13.5	14.1	15.8	15.8	13.2	14.1	14.7	15.6	13	14.3	15.5	16.7
	Ht	(%)	40	44.8	52.5	51.7	42.7	41.8	47.9	47	43.7	35.9	48.8	47.4	45.4	46.8	48.1	51.6	42.5	47.6	51.14	55.5	45.6	47.7	49	52.4	46.9	49	53.1	57.1
	VCM	(fL)	54.4	49.5	65.3	66.1	51.1	50.5	55.7	55.5	47.9	49.2	54.3	52.9	51.1	51.7	52.7	54	49.5	49.4	53.8	55.9	50.6	50.6	53.6	53.4	53.3	49.6	61.5	54.8
	HCM	(pg)	15.7	15.7	19.4	17.6	15.7	15.4	16.2	16.4	15.1	15.3	16.6	16.2	14.6	15.4	15.8	15.6	14.8	15.3	16.1	16.3	14.7	14.9	15.4	15.6	15.4	15.1	15.7	16
	CHCM	(%L)	25.9	25.5	28.8	31.7	29.1	29.6	31.1	31.1	29.1	29.2	31.8	31.1	27.9	28.6	31.8	30	29.2	28.3	29.9	30.7	28.4	29.1	30.4	32.3	28.1	28	29.8	30.8
	Plaq	(10 ³ /μL)	254	135	901	895	403	158	653	585	324	286	725	989	299	452	878	925	415	290	764	690	340	219	683	892	490	369	724	868
	RDW-SD	(fL)	27.8	22.4	44.7	45	23.4	23.5	26	27.6	21	21.8	27.2	28.5	25.4	26	27.9	32.5	25.1	22.8	26.5	29	23.8	24.5	26.7	28.1	27	23.9	41	30.4
	RDW-CV	(fL)	14.6	15.9	21.1	21.2	13.4	13.8	15.6	17.7	15.5	16.1	18.2	18.6	16.6	17.3	18.2	20.5	16.3	16.7	18.2	18.6	16.6	16.5	17.3	19.3	17	16.8	19.9	19.3
	VMP	(fL)	7.1	7.1	8.5	8.9	7	7	7.3	7.6	7.3	6.8	7.8	8.1	6	7.3	7.9	8.3	6.7	7.1	7.6	8.5	6.7	6.6	7.2	8.6	6.6	7.1	7.8	7.6
	Leuc.	(10 ³ /μL)	2.49	2.49	8.91	8.21	1.93	3.12	4.58	5.99	2.53	1.95	9.39	3.82	1.89	2.4	3.76	4.71	3.49	2.18	10.55	6.33	1.38	3.04	3.13	3.95	1.17	1.56	4.71	5.05
	Neut.	(%)	11.6	11.8	25.3	29.9	17	7.5	23.4	20.2	8.8	10.1	18.8	19.1	5.7	11.5	24	19.9	8.8	8.7	24.8	11.7	10.2	7.2	23.9	18.8	9.1	3.7	18.8	11.2
	Linf.	(%)	73.9	73.3	84.8	85.8	69.4	78.2	82.2	91.5	80	81	90.6	95.6	74.5	78.6	93.4	88.3	73.5	87.7	91.2	91.3	76.1	9.3	91	92.2	81.2	88.3	89	96.1
	Mon.	(%)	0.8	0.7	4.6	5.3	0.2	0.2	1.7	1.6	0.5	0	2.3	2.1	0.7	0.2	4.3	3.1	0.2	0	2.1	0.8	0.5	0	3.2	1.8	0.4	0	2.9	2.1
	Eos.	(%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0	0	0.3	0.2	0	0	0	0.5	0	0	0.2	0	0	0	0.6	0	0	0	0
Bas.	(%)	0	0	0.3	0.2	0	0	0	0.3	0	0	0	0.3	0	0	0.2	0.4	0	0	0.5	0.2	0	0	0.3	0.2	0	0	0.7	0.7	

ANEXO 3

ANEXO 3 - Valores mínimos e máximos para os parâmetros bioquímicos de Camundongos da linhagem SWISS , machos e fêmeas de diferentes idades, provenientes do Biotério Central - UT/ CCBS/ UFMS

Parâmetros	Análito	unidade	Idade																											
			30 dias				45 dias				60 dias				75 dias				90 dias				105 dias				120 dias			
			mín.		máx		mín.		máx		mín.		máx		mín.		máx		mín.		máx		mín.		máx		mín.		máx	
			♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Bioquímicos	Alb.	(g/dL)	2.5	2.5	3	3.4	3.1	3	3.6	3.4	2.3	3.1	3.7	3.8	2.8	2.7	3.9	3.7	2.7	3.1	3.2	3.6	2.5	3	2.9	3.5	2.8	3.1	3.7	3.6
	Ps	(g/dL)	3.6	3.5	4.7	5.2	3.9	3.9	5.6	5.1	4.6	5	5.2	5.4	3.8	3.5	6.2	4.9	3.7	4.4	5.8	5.5	3.5	4.4	4.2	4.9	4	3.6	5.5	4.9
	ALT	(U/L)	13	17.6	32	42	15.6	15.5	31	43.4	25	24	44	36	26.7	20.5	107	37.4	29.2	18.9	44	44	25.4	21.1	60.8	92.3	20.6	28.2	162.2	64.3
	Col.	(mg/dL)	69	92.4	120.8	117	107	80	129	90.5	92	92	136	136	101.2	70.3	185	94.6	90.1	80.3	114	103	79.7	72.7	107.2	100.3	79.1	62	115.8	106
	Crea	(mg/dL)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.4	0.2	0.2	0.2	0.3	0.4	0.2	0.2	0.3	0.4	0.2	0.2	0.2	0.3
	Trig	(mg/dL)	162	218.9	267.5	314	193	183.3	386	213	251	208	471.3	338	172.7	121.9	303	269.9	127.4	237	390.1	322.3	89.3	223.5	250.3	386.1	171.5	169.7	228.7	309.2
	VLDL	(mg/dL)	48,9	43,8	55,5	47,4	65,2	36,7	77,2	46,7	73,4		94,3		34,5	24,4	59,6	76,9	25,5	47,6	78	66,5	19,9	44,7	59,6	77,2	34,3	33,9	57	61,8
	Glob	(g/dL)	0,9	1	1	1,1	1	0,9	1,1	1,4	0,9		1,5		1,1	0,8	1,3	1,3	1	1	1,5	1,4	1	0,9	1,3	1,5	1	0,9	1,8	1,7
	A:G		2	2,5	2,5	3,2	2,8	2,1	3,9	3,6	2,2		3,6		2,5	2,6	2,7	3,5	1,9	2,6	2,6	3,5	2,3	2,3	2,6	2,6	1,9	2,2	3,2	3,1