

Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná

Jailson Araújo Dantas¹, Celia Regina Ambiel², Roberto Kenji Nakamura Cuman¹, Silmara Baroni¹ e Ciomar Aparecida Bersani-Amado^{1*}

¹Laboratório de Inflamação do Departamento de Farmácia e Farmacologia, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil.

²Departamento de Ciências Morfofisiológicas, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil. *Autor para correspondência. e-mail: cabamado@uem.br

RESUMO. O objetivo deste trabalho foi estabelecer valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos (bioquímicos, hematológicos e urinários) de ratos provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. Foram utilizados ratos machos, normais e saudáveis da linhagem Wistar, com peso de 200 a 220 g. Foi avaliado o perfil hematológico (leucócitos: totais, mononucleares e polimorfonucleares) e a determinação bioquímica de vários constituintes plasmáticos (aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, glicose, creatinina, fosfatase alcalina, fosfatase ácida, uréia, colesterol total, colesterol HDL, triglicerídeos, teste de tolerância à glicose GTT) e urinários (glicose, creatinina). É imprescindível que cada laboratório estabeleça seu conjunto de valores de referência dos animais normais, de acordo com a dieta, a linhagem, o sexo e a idade de cada espécie utilizada. Assim, através deste trabalho, o pesquisador pode identificar desvios dos parâmetros, facilitando a escolha dos animais para o estudo.

Palavras-chave: ratos, análise bioquímica plasmática, perfil hematológico, parâmetros urinários.

ABSTRACT. Reference values of some physiological parameters in the rats of the Central Biotery at the State University of Maringá, State of Paraná. The present work was carried out to establish reference values for some physiological parameters (biochemical, hematological and urinary) in rats proceeding from the Central Biotery at the State University of Maringá, State of Paraná. Normal male Wistar rats weighing 200-220 g were used. The hematological profile (total leukocytes, mononuclear and polymorphonuclear cells count), the clinic chemistry (aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, glucose, creatinine, alkaline phosphatase, acid phosphatase, urea, cholesterol, HDL-c, triglycerides, glucose tolerance) and urinary parameters (glucose and creatinine) were determined. Each laboratory should establish a database of reference values for their animals, according to diet, strain, sex and age for each species used. Thus, in this work, a database is provided regarding reference values of some physiological parameters in rats for use in experimental investigations.

Key words: rats, blood chemical analysis, hematological profile, urinary parameters.

Introdução

Geralmente, os valores de parâmetros fisiológicos dos animais de experimentação são determinados em países com longa tradição na manutenção de biotérios. Desta forma, esses valores passam a ser admitidos como constantes para os animais de uma mesma linhagem, espalhados pelos mais diversos países (Pinheiro *et al.*, 1997/98).

Apesar de que cada espécie de animal possui mecanismos próprios de controle dos valores de parâmetros fisiológicos, é sabido que podem exibir variações que estão relacionadas ao sexo, linhagem e genótipo, podendo estas variações serem decorrentes

de diversos fatores como: idade, dieta, manuseio, e ambiente. Adicionalmente, os animais experimentais podem se comportar de modo diferente, dependendo das condições a que são submetidos, sendo também passíveis de sofrerem influência de vários fatores ecológicos, característicos de cada região do planeta (Menendez *apud* Pinheiro *et al.*, 1997/98).

Vários trabalhos da literatura apresentam valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos (bioquímicos, hematológicos, peso, dieta, etc.) obtidos de ratos Wistar normais; dentre estes podemos citar: Wolford *et al.* (1986); Amaral *et al.* (1995/96); Lillie *et al.* (1996); Pinheiro *et al.* (1997/98). Analisando estes trabalhos, é possível

observar algumas discrepâncias entre alguns parâmetros avaliados, o que confirma as variações intraespécies, decorrentes de diferenças geográficas e de manuseio, anteriormente citadas. Neste contexto, é imprescindível que cada laboratório ou biotério estabeleça um conjunto próprio de valores de referência dos animais normais controles, de acordo com a linhagem, sexo, idade de cada espécie utilizada. Segundo Wolford *et al.* (1986), o conhecimento destes parâmetros é muito importante na pré-seleção dos animais, na avaliação e observação dos resultados obtidos nos procedimentos experimentais, assim como na análise das modificações induzidas por processos patológicos.

O objetivo do presente trabalho foi estabelecer valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos que possam ser utilizados pelos laboratórios de pesquisa que utilizam ratos Wistar, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná.

Material e métodos

Animais e parâmetros fisiológicos avaliados

Os dados foram obtidos de ratos machos, adultos, normais e saudáveis da linhagem Wistar, pesando 200-220 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. É importante relatar que os dados apresentados neste trabalho são provenientes de resultados experimentais, obtidos de animais controles utilizados em estudos realizados no Laboratório de Inflamação do Departamento de Farmácia e Farmacologia da Universidade Estadual de Maringá durante aproximadamente cinco anos.

Foram analisados os seguintes parâmetros fisiológicos: (1) sangue: contagem global e diferencial de leucócitos, e análise bioquímica (glicose, triglicerídeos, colesterol total, colesterol HDL, uréia, creatinina, atividade das enzimas fosfatases (ácida-FAC e alcalina-FALC), aspartato amino transferase (AST), alanina amino transferase (ALT) e teste de tolerância à glicose (GTT); (2) urina: volume urinário de 24 de horas, glicose e creatinina.

No final do período experimental, através de necropsia dos animais, determinaram-se o peso de vários órgãos e as razões. Peso de órgãos / 100 g de peso corporal.

Contagem global e diferencial de leucócitos no sangue

O sangue foi coletado da extremidade distal da cauda e da veia cava inferior do animal. A contagem global dos leucócitos foi realizada em câmaras de Neubauer, a partir de amostras de sangue diluídas na proporção de 1:20 em líquido de Turk. Para a

diluição, foram utilizadas pipetas conta-glóbulos de Thomas. O material assim obtido foi homogeneizado em agitador magnético, durante 45 segundos. A contagem diferencial das células da série leucocitária foi realizada em esfregaços de sangue fixados e corados pelo método pancrômico de Leishman. As células foram contadas em microscópio óptico, usando-se objetiva de imersão em óleo.

Coleta de sangue para avaliação bioquímica

O sangue foi coletado de animais alimentados ou sob jejum de 15 horas. Os ratos foram anestesiados com pentobarbital (Hypnol 3%®, Fontover, i.p.) na dose de 40 mg kg⁻¹ de peso corporal e o sangue foi coletado através de punção da veia cava inferior, utilizando-se seringa heparinizada. O plasma foi separado após centrifugação das amostras a 2500 rpm por 10 minutos.

Determinação da glicemia

A determinação dos níveis plasmáticos de glicose foi realizada em alíquotas de plasma (10 µL), utilizando método enzimático colorimétrico da glicose-oxidase (Gold Analisa®). A glicemia foi avaliada em animais alimentados e sob jejum de 12 horas. Os resultados foram expressos em mg dL⁻¹.

Determinação da concentração de colesterol total

O colesterol total foi determinado pelo método enzimático colorimétrico de colesterol-oxidase (Gold Analisa®). Neste método, a colesterol-oxidase catalisa a oxidação do colesterol produzindo o peróxido de hidrogênio. Através de uma reação oxidativa catalisada pela peroxidase, o peróxido de hidrogênio reage com 4-aminoantipirina e fenol, formando um complexo de cor vermelha (quinoneimina), onde a intensidade de cor é proporcional à concentração de colesterol na amostra. Os resultados foram expressos em mg dL⁻¹.

Determinação da concentração de colesterol HDL

Os quilomicrons e a lipoproteína de muito baixa densidade (LDL) se precipitam quantitativamente. Após centrifugação, o sobrenadante contém as lipoproteínas de elevada densidade (HDL), cujo colesterol é quantificado espectrofotometricamente, utilizando o mesmo método de dosagem do colesterol total descrito acima. Os resultados foram expressos em mg dL⁻¹.

Determinação da concentração de triglicerídeos

Os triglicerídeos foram determinados pelo método enzimático colorimétrico da glicerol-3-fosfato-oxidase (Gold Analisa®). Neste método os triglicerídeos sofrem ação das lipases, resultando na molécula de glicerol, e

este é posteriormente convertido em glicerolfosfato, que é oxidado a dihidroacetona e água oxigenada por ação da glicerol-3-fosfato oxidase. Através de uma reação oxidativa catalisada pela peroxidase, a água oxigenada reage com a 4-aminoantipirina e 4-clorofenol, produzindo a quinoneimina (vermelha), em que a intensidade de cor é proporcional à concentração de triglicerídeos na amostra. Os resultados foram expressos em mg dL^{-1} .

Determinação da concentração de uréia no plasma

A determinação da concentração de uréia no plasma foi realizada através de um método enzimático colorimétrico (Gold Analisa®). Neste método, a uréia é hidrolisada pela urease em íons amônia e CO_2 . Em meio alcalino, os íons amônia reagem com salicilato e hipoclorito de sódio, para formar indofenol. A absorbância do complexo formado, medida em 600 nm, é diretamente proporcional à concentração de uréia na amostra.

Determinação da concentração de creatinina no plasma

A determinação da concentração de creatinina no plasma foi realizada através de um método enzimático colorimétrico (Gold Analisa®). Neste método a creatinina reage com o picrato alcalino, formando um complexo que é medido fotometricamente. A adição de um acidificante abaixa o pH, promovendo a decomposição do picrato de creatinina e deixando inalterada a cor derivada dos cromógenos, que também é medida fotometricamente. A diferença entre a leitura fotométrica antes e após a acidificação permite quantificar a concentração de creatinina verdadeira.

Determinação da concentração das transaminases e fosfatases

A atividade de fosfatases (ácida-FAC e alcalina-FALC) e de transaminases (aspartato amino transferase - AST e alanina amino transferase - ALT) no plasma foi determinada utilizando kit comercial (Gold Analisa®), por método Cinético Colorimético.

Coleta de urina para avaliação bioquímica

Os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas por período de 24 horas com alimentação e água à vontade. Foram determinados os seguintes parâmetros: volume urinário, glicose e creatinina. Para determinação do volume urinário, a urina de 24 horas foi coletada em frascos de vidro e o seu volume medido em proveta graduada.

Determinação da glicosúria

A determinação da glicosúria foi realizada em alíquotas de urina ($10 \mu\text{L}$), utilizando método enzimático colorimétrico da glicose-oxidase (Gold Analisa®). A glicosúria foi avaliada em animais alimentados.

Determinação da concentração de creatinina urinária

A concentração de creatinina na urina foi determinada pelo mesmo método descrito acima, ou seja, para determinação da concentração de creatinina no plasma.

Teste de tolerância à glicose (GTT)

Os animais sob jejum de 15 horas e anestesiados com pentobarbital sódico (Hypnol 3%®, 40 mg kg^{-1} de peso corporal, via intraperitoneal) foram submetidos à laparotomia e exposição da veia cava inferior. Inicialmente foi coletada uma amostra de sangue (1 mL) que foi utilizada para a determinação da glicemia basal (tempo zero). Após esta coleta os animais receberam dose única de glicose ($0,5 \text{ g kg}^{-1}$ de peso corporal) por via endovenosa. Amostras de $0,5 \text{ mL}$ de sangue foram coletadas após 5, 10, 20, 30 e 60 minutos da injeção de glicose. Estas amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 10 minutos. A glicemia foi determinada pelo método enzimático colorimétrico da glicose-oxidase (Gold Analisa®). Os resultados foram avaliados por meio da curva glicêmica.

Resultados

Todos os dados demonstrados foram obtidos de ratos da linhagem Wistar. O número de leucócitos no sangue dos animais está apresentado na Tabela 1 e 2. Os dados apresentados nas Tabelas 3, 4 e 5 são referentes aos parâmetros bioquímicos analisados. A Tabela 6 mostra o peso dos rins, fígado, coração e pulmão. Nas tabelas estão demonstrados o número de animais por grupo (N), a média e o desvio padrão da média (DP) dos parâmetros avaliados. A curva glicêmica referente ao teste de tolerância à glicose (GTT) é mostrado na Figura 1.

Tabela 1. Contagem global e diferencial de leucócitos no sangue de ratos.

Células mm^{-3}	N	Média	Desvio Padrão
Leucócitos totais	32	9 402	1662,0
Polimorfonucleares	32	2 082 (21,6%)	751,5
Mononucleares	32	7 323 (78,3%)	1 213,0

O sangue foi coletado da extremidade distal da cauda dos animais. N= número de animais por grupo. Os resultados representam a Média $\pm$ Desvio Padrão da Média, em valores absolutos e relativos (%).

Tabela 2. Contagem global e diferencial de leucócitos no sangue de ratos.

Células mm ⁻³	N	Média	Desvio Padrão
Leucócitos totais	15	6 383	763
Polimorfonucleares	15	1 580 (24,75%)	553
Mononucleares	15	4 803 (75,24%)	255

O sangue foi coletado da veia cava inferior dos animais. N= número de animais por grupo. Os resultados representam a Média $\pm$ Desvio Padrão da Média, em valores absolutos e relativos (%).

Tabela 3. Parâmetros bioquímicos no plasma de ratos sob jejum de 15 horas.

Parâmetros	Unidade	N	Média	Desvio Padrão
Colesterol total	mg dL ⁻¹	51	87	18,1
Colesterol HDL	mg dL ⁻¹	37	48	11,4
Triglicérides	mg dL ⁻¹	38	82	24,7
Uréia	mg dL ⁻¹	35	48	7,6
Creatinina	mg dL ⁻¹	42	0,5	0,07
Glicemia	mg dL ⁻¹	64	108	17,4
Glicemia*	mg dL ⁻¹	32	136	11,3

*Valor da glicemia em ratos alimentados; N = número de animais por grupo. Os resultados representam a Média $\pm$ Desvio Padrão da Média.

Tabela 4. Atividade das enzimas fosfatases (ácida-FAC e alcalina-FALC) e de transaminases (aspartato amino transferase - AST e alanina amino transferase - ALT) no plasma de ratos, sob jejum de 15 horas.

Parâmetros	Unidade	N	Médias	Desvio Padrão
FAC	U L ⁻¹	19	32	40,3
FALC	U L ⁻¹	42	124	6,1
AST	U L ⁻¹	38	81	11,7
ALT	U L ⁻¹	42	51	12,3

N = número de animais por grupo. Os resultados representam a Média $\pm$ Desvio Padrão da Média.

Tabela 5. Parâmetros bioquímicos na urina de 24 horas de ratos alimentados.

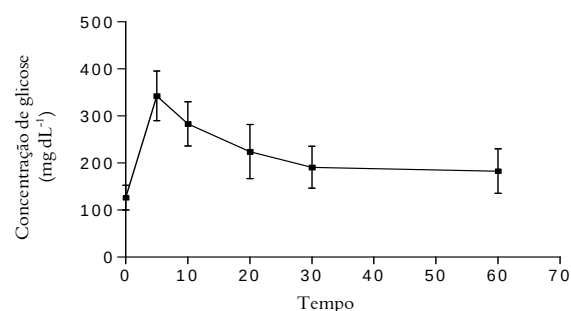
Parâmetros	Unidade	N	Média	Desvio Padrão
Volume de urina	mL	20	6,3	1,5
Glicose	mg dL ⁻¹	17	13,2	9,2
Creatinina	mg dL ⁻¹	26	67,2	12,8

N = número de animais por grupo. Os resultados representam a Média $\pm$ Desvio Padrão da Média.

Tabela 6. Peso dos órgãos de ratos (g 100 g⁻¹ de peso corporal).

Órgãos	N	Médias	Desvio Padrão
Rins*	12	0,61	0,04
Fígado	12	2,90	0,34
Coração	12	0,32	0,02
Pulmão	12	0,53	0,07

N = número de animais por grupo. * Valor correspondente ao peso de ambos rins (direito e esquerdo). Os resultados representam a Média $\pm$ Desvio Padrão da Média.

**Figura 1.** Teste de tolerância à glicose (GTT) obtidos de ratos normais, sob jejum, antes e após administração de glicose (via endovenosa - 0,5 mg kg⁻¹). Cada ponto representa a Média $\pm$ Desvio Padrão de 25 animais.

Discussão

Neste trabalho foi estabelecido alguns parâmetros fisiológicos e bioquímicos de referência, de ratos normais da linhagem Wistar do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. A análise dos dados mostrou pequenas variações individuais quando cada parâmetro foi avaliado. No entanto, quando comparado os resultados do presente estudo com aqueles apresentados na literatura, ficou claro que alguns resultados são semelhantes, enquanto outros são discordantes. Por isso, a importância de estabelecer valores de referência próprios para cada biotério ou laboratório.

Com relação ao perfil hematológico, é importante ressaltar que a contagem do número de leucócitos circulantes foi maior em amostras de sangue coletadas da cauda quando comparadas às amostras coletadas da veia cava inferior do animal (Tabelas 1 e 2). Resultados similares foram relatados por outros autores (Nemzek *et al.*, 2001; Doeing *et al.*, 2003). A razão para esta diferença não é claramente entendida. Segundo Northern *et al.* (1994), a diferença observada poderia ser atribuída à demanda imunológica do hospedeiro nos vários locais onde as amostras de sangue são coletadas (cauda, olho, coração). Outra teoria é que a resistência vascular e estase sanguínea, gerada pela maior área de superfície nos leitos capilares, pode ser responsável pela maior contagem de leucócitos nas amostras de sangue coletadas da cauda (Quimby *et al.*, 1948). Além disso, tem sido sugerido que o estresse induzido pelo próprio procedimento, no momento da coleta das amostras de sangue, poderia interferir na contagem de leucócitos (Doeing *et al.*, 2003).

Os resultados da concentração plasmática de glicose dos animais sob jejum, demonstrados na Tabela 3, estão de acordo com os apresentados em outros trabalhos (Wolford *et al.*, 1986; Sharp e La Regina, 1998; Cardenas, 2005).

Os valores de creatinina plasmática deste estudo (Tabela 3) são inferiores aos descritos por Novelli *et al.* (1998), porém são similares àqueles apresentados por Wolford *et al.* (1986). Doyama *et al.* (2005) encontraram valores de colesterol total e colesterol-HDL semelhantes aos do presente estudo (Tabela 3). Entretanto, com relação aos valores de triglicérides (Tabela 3) estes foram superiores aos dos mesmos autores. A concentração de uréia plasmática (Tabela 3) avaliada neste estudo se assemelhou à de Matos *et al.* (2005).

Os resultados obtidos para a atividade da enzima fosfatase alcalina (Tabela 4) foram superiores aos encontrados por Cardenas (2005). Os valores da

atividade das transaminases (AST e ALT) apresentados na Tabela 4 foram superiores aos encontrados por El Demerdash *et al.* (2004), porém semelhantes àqueles apresentados por Wolford *et al.* (1986).

Duncan e Prasse (1982) salientam que os diferentes métodos utilizados para a realização de testes enzimáticos variam, fornecendo valores muito vezes discrepantes. Por isso a comparação com outros estudos, mesmo quando a unidade utilizada for a mesma, só será válida se os mesmos substratos, pH e temperatura de reação forem utilizados. Adicionalmente, Haldelman e Blue (1993) observaram que a metodologia utilizada sempre interfere com os resultados laboratoriais. Lillie *et al.* (1996) relatam ainda, que os resultados só podem ser generalizados em determinadas condições específicas de estudo, com a mesma linhagem de ratos, idade e dieta, assim como a metodologia, que poderiam interferir nos resultados.

Finalmente, a análise comparativa dos nossos resultados com aqueles apresentados na literatura demonstra claramente que variações intraespécies existem, sendo provavelmente resultantes de diferenças de ordem ambiental, bem como de manuseio e/ou metodologia empregada. É imprescindível que essas variações sejam consideradas durante a pré-seleção dos animais, na avaliação e observação dos resultados obtidos nos procedimentos experimentais, assim como na análise das modificações induzidas por processos patológicos.

Conclusão

O acompanhamento e a avaliação do controle bioquímico do plasma, urina e de leucócitos, feitos em ratos machos, normais e saudáveis da linhagem Wistar, com peso entre 200 a 220 g, procedentes do Biotério Central da UEM, apresentou resultados que exibem os valores analisados por um período de cinco anos. A média do conjunto de valores obtidos, sua distribuição e variações oferece valiosa referência para a pré-seleção de animais para procedimentos experimentais.

Agradecimento

Os autores agradecem os Professores Pesquisadores, os alunos de Pós-graduação, de Iniciação Científica, Estagiários e todos os Funcionários do Laboratório de Inflamação do Departamento de Farmácia e Farmacologia da, Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná.

Referências

- AMARAL, A.S. *et al.* Valores de referência de constituintes bioquímicos serviços para cães da região de Santa Maria, RS. *Rev. Fac. Zootec. Vet. Agro.*, Uruguaiana, v. 2-3, n. 1, p. 81-86, 1995/1996.
- CARDENAS, V.M.A. *Identificação dos ativos e o efeito das frações hidroalcoólica e acetato de etila de folhas de Smilax szechuanensis (yacón) sobre parâmetros bioquímicos de ratos Wistar normais e com diabetes induzido por estreptozotocina.* 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- DOEING, D.C. *et al.* Gender dimorphism in differential peripheral blood leukocyte counts in mice using cardiac, tail, foot, and saphenous vein puncture methods. *BMC Clin. Pathol.*, London, v. 3, p. 1-6, 2003.
- DOYAMA, J.T. *et al.* Chemical investigation and effects of the tea of *Passiflora alata* on biochemical parameters in rats. *J. Ethnopharmacol.*, Lausanne, v. 96, p. 371-374, 2005.
- DUNCAN, J.R.; PRASSE, K.W. *Patologia Clínica Veterinária*. Apêndice I. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1982.
- EL-DEMERDASH, F.M. *et al.* Cadmium-induced changes in lipid peroxidation, blood hematology, biochemical parameters and semen quality of male rats: protective role of vitamin E and β -carotene. *Food. Chem. Toxicol.*, Oxford, v. 42, p. 1563-1571, 2004.
- HALDELMAN, C.T.; BLUE, J. *Laboratory data: read beyond the numbers.* In: *Veterinary laboratory medicine: in practice*. Trenton: Veterinary Learning Systems, 1993.
- LILLIE, L.E. *et al.* Reference values for young normal Sprague-Dawley rats: weight gain, hematology and clinical chemistry. *Hum. Exp. Toxicol.*, Houndmills, v. 15, n. 8, p. 612-616, 1996.
- MATOS, S.L. *et al.* Dietary models for inducing hypercholesterolemia in rats. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, Curitiba, v. 48, n. 2, p. 203-209, 2005.
- NEMZEK, J.A. *et al.* Differences in normal values for murine white blood cell counts and other hematological parameters based on sampling site. *Inflamm. Res.*, Basel, v. 50, p. 523-527, 2001.
- NOVELLI, E.L.B. *et al.* Risk assessment of cadmium toxicity on hepatic and renal tissues of rats. *Environ. Res.*, New York, v. 79, p. 102-105, 1998.
- NORTHERN, A.L. *et al.* Cyclic changes in the concentrations of peripheral blood immune cells during the normal menstrual cycle. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, Malden, v. 207, p. 81-88, 1994.
- PINHEIRO, D.C.S.N. *et al.* Parâmetros Hematológicos de Camundongos e ratos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. *Bol. Inf. Cobeia*, São Paulo, n. 3, p. 6-9, 1997/98.
- QUIMBY, F.H. *et al.* Total white blood cell counts of peripheral and heart blood samples of the rat. *Science*, Washington, D.C., v. 107, p. 447, 1948.
- SHARP, P.E.; LA REGINA, M.C. *The laboratory rat*. London: CRC Press, 1998.

WOLFORD, S.T. *et al.* Reference range data base for serum chemistry and hematology values in laboratory animals. *J. Toxicol. Health*, Washington, D.C., v. 18, p. 161-188, 1986.

Received on July 28, 2006.

Accepted on December 08, 2006.