

Perfil hematológico e bioquímico de camundongos da linhagem Balb-c

Haematological and Biochemical Profile of Balb-c Mice

Brenna de Sousa Barbosa, Érika Almeida Praxedes, Mikael Almeida Lima, Muriel Magda Lustosa Pimentel, Fernanda Araujo Santos, Parmênedes Dias Brito, Ivana Cristina Nunes Gadelha Lelis, Michelly Fernandes de Macedo & Marcelo Barbosa Bezerra

ABSTRACT

Background: Animal models are widely used in scientific research because of the ability to generate information from an organism like everything under a given experimental condition. Hematological and biochemical tests in laboratory animals are essential for the validation of several scientific studies. In addition, it standardizes physiological values for these animals according to their sex, age, lineage, environment, and nutritional status. The present work aims to establish reference values for biochemical and hematological standards in Balb/c mice, for males and females.

Materials, Methods & Results: A total of 50 male and female mice were used at reproductive age. The procedures for collecting, processing, and analyzing the samples were standardized. The collected blood samples were immediately transferred to eppendorf tubes containing heparin, and intended for hematological and biochemical evaluation. The hematological evaluation consisted of Red blood cell count (RBC), Leukocyte counts (WBC), Platelet counts (PLT), Hematocrit (HCT), Hemoglobin concentration (HGB), Mean corpuscular volume (MCV), and Mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC). Already the quantified biochemical parameters were: urea, creatinine, alanina aminotransaminase (ALT), aspartato aminotransaminase (AST) and fosfatase alcalina (FAL). The differential leukocyte count was also performed. Hematological results obtained for males and females were: 9.19 ± 3.35 ($10^6/\text{mm}^3$) and 7.3 ± 2.01 ($10^6/\text{mm}^3$) of RBC; $35.8 \pm 6.7\%$ and $38.44 \pm 3.93\%$ of HCT; 11.51 ± 2.17 g/dL and 11.85 ± 1.56 g/dL of HGB; 45.83 ± 15.03 fL and 60.26 ± 18.25 fL of VCM; $31.80 \pm 1.15\%$ and $31.88 \pm 0.99\%$ of MCHC; and, 5380 ± 1994.21 ($10^3/\text{mm}^3$) and 3564 ± 1071 ($10^3/\text{mm}^3$) of WBC. The platelet counts were 878.92 ± 84.19 and 678.28 ± 227.21 , for males and females respectively. And for differential leukocyte counts, for males and females: eosinophils $2.12 \pm 1.09\%$ and $2.16 \pm 1.71\%$; monocytes $2.84 \pm 1.03\%$ and $2.68 \pm 1\%$; lymphocytes $68 \pm 8.36\%$ and $71.76 \pm 5.9\%$; neutrophils $27.04 \pm 8.55\%$ and $22.96 \pm 5.54\%$. Basophils were not quantified in the samples. As for the biochemical parameters, values of 54.16 ± 27.8 UI/L and 29.72 ± 4.4 UI/L of ALT; 89.56 ± 47.73 UI/L and 71.32 ± 8.12 UI/L of AST; 3.76 ± 2.08 UI/L and 2.32 ± 0.85 UI/L of FAL; 31.76 ± 21.08 mg/dL and 41.48 ± 13.61 mg/dL of urea; and 0.76 ± 0.18 mg/dL and 0.44 ± 0.11 mg/dL of creatinine.

Discussion: The mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin concentration, leukocyte, and platelet counts diverged from those found in literature. For the biochemical values, it was observed that creatinine values were different from those exhibited by other authors. Such divergences might be explained by the activity of endocrine organs, such as the production and/or release of activation/differentiation factors, and stress, applied methodology, lineage, or individual variability. In addition, differences in the methodologies applied may be responsible for variations in hematological and biochemical values, requiring the standardization of the equipment and reagents used, as well as the adoption of a range that represents the minimum and maximum values within the normal physiological standard for given mouse lineage. In conclusion, the values presented in the present work are within the variation curve for rodents, and can be used as reference for other studies that use these animals.

Keywords: bioterium, laboratory animals, hematological values, biochemical profile, blood.

Descritores: biotério, animais de laboratório, valores hematológicos, perfil bioquímico, sangue.

INTRODUÇÃO

Modelos animais são amplamente empregados nas pesquisas científicas, visto que permitem gerar informações de um organismo como todo, contribuindo dessa forma para o desenvolvimento da ciência ao longo dos anos [2]. Para a experimentação torna-se essencial o conhecimento dos parâmetros hematológicos e bioquímicos dos animais de laboratório utilizados, visto que a partir desses dados é possível avaliar individualmente o perfil fisiológico e as alterações funcionais dos órgãos vitais [16].

A coleta de sangue em camundongos é necessária para a validação de diversos estudos científicos, principalmente atividade de farmacoterápicos, pois serve como referência do estado de sanidade do animal [8]; além de expressar informações importantes quanto às condições clínicas, nutricionais e fisiológicas [16].

Os parâmetros bioquímicos dos animais de laboratório também são de suma importância, visto que estes servem como base na avaliação das alterações funcionais dos órgãos, bem como permitem estabelecer valores de referência. Em camundongos e ratos, sabe-se que os parâmetros bioquímicos são influenciados pela idade, dieta, pelo manuseio, meio ambiente, entre outros fatores [1]. Por essa razão, os biotérios das instituições de pesquisas devem disponibilizar de ambientes padronizados e dados de referência para cada linhagem [7].

As pequenas quantidades de sangue retiradas desses animais dificultam a criação de listas de referência para valores hematológicos e bioquímicos específicos para cada linhagem de camundongos [1]. Dessa maneira, o presente trabalho teve como objetivo estabelecer valores de referência para padrões bioquímicos e hematológicos de camundongos das linhagens Balb-c.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e manejo

Foram utilizados 50 camundongos da linhagem Balb-c, sendo 25 fêmeas e 25 machos, ambos adultos entre 2 a 4 meses, saudáveis, pesando entre 20 e 40 gramas. Os animais foram criados em racks mini-isoladores¹ com pressão positiva, sob condições ambientais padronizadas (ciclo 14 h claro/10 h escuro e temperatura entre $22 \pm 2^\circ\text{C}$), com água *ad libitum* e ração apropriada para a espécie.

Coleta de sangue

A coleta das amostras de sangue foi realizada durante o período da manhã, a fim de se evitar variações nos parâmetros. Inicialmente, os animais foram anestesiados com 2,2,2-tribromoetanol² a 2,5%, na dose de 20 mL/kg do peso corpóreo por via intraperitoneal. Após a anestesia geral, foi realizado procedimento de coleta segundo Hoff [6]. Foram obtidos entre 0,3 a 0,5 mL de sangue por animal. As amostras coletadas foram armazenadas em eppendorfs contendo heparina, destinada à avaliação hematológica completa e posteriormente a bioquímica plasmática.

Avaliação hematológica

A avaliação hematológica consistiu na determinação do hemograma, incluindo contagens globais de hemácias (RBC), leucócitos (WBC), plaquetas (PLT), determinação do hematócrito (HCT) e da concentração de hemoglobina (HGB). A partir dos valores obtidos para hemácias, hematócrito e hemoglobina, foram calculados os índices hematimétricos, volume corpuscular médio (MCV) e concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC). As análises hematológicas foram realizadas com o auxílio do Analisador Automático Hematológico Veterinário ABC VET³. As contagens diferenciais de leucócitos foram realizadas em esfregaços sanguíneos corados com Panótico Rápido⁴, enumerando-se 100 células e estabelecendo-se as fórmulas leucocitárias relativas e absolutas.

Avaliação bioquímica

O restante das amostras sanguíneas foram mantidas a temperatura ambiente em microtubos previamente identificados e centrifugados⁵ a 1200 g por 10 min para obtenção do plasma, a partir do qual foram dosados ureia, creatinina, alanina aminotransaminase (ALT), aspartato aminotransaminase (AST) e fosfatase alcalina (FAL). Todas as análises bioquímicas foram validadas e realizadas por meio de espectrofotometria, utilizando-se o analisador bioquímico semi-automático Bioplus 2000⁶ e kit reagentes⁷.

RESULTADOS

A determinação dos parâmetros hematológicos de camundongos da linhagem Balb/c estão descritos na Tabela 1. Na Tabela 2 são apresentadas as análises bioquímicas do plasma dos camundongos Balb/c, machos e fêmeas.

Tabela 1. Parâmetros hematológicos de camundongos fêmeas e machos da linhagem Balb/c.

Parâmetro	Unidade	Fêmeas	Machos
Hemácias	106/mm ³	7,3 ± 2,01	9,19 ± 3,35
Hematócrito	%	38,44 ± 3,93	35,8 ± 6,7
Hemoglobina	g/dL	11,85 ± 1,56	11,51 ± 2,17
VCM	fL	60,26 ± 18,25	45,83 ± 15,03
CHCM	%	31,88 ± 0,99	31,80 ± 1,15
Leucócitos	10 ³ /mm ³	3564 ± 1071	5380 ± 1994,21
Eosinófilos	%	2,16 ± 1,71	2,12 ± 1,09
Monócitos	10 ³ /mm ³	78,88 ± 69,44	113 ± 70,18
	%	2,68 ± 1	2,84 ± 1,03
Linfócitos	10 ³ /mm ³	100,28 ± 55,05	155,32 ± 82,21
	%	71,76 ± 5,9	68,00 ± 8,36
Basófilos	10 ³ /mm ³	2573,36 ± 830,55	3673,28 ± 1497,78
	%	0,00	0,00
Neutrófilos	10 ³ /mm ³	0,00	0,00
	%	22,96 ± 5,54	27,04 ± 8,55
Plaquetas	10 ³ /mm ³	811,48 ± 307,26	1438,40 ± 612,93
		678,28 ± 227,21	878,92 ± 84,19

RCB= Contagem de Eritrócitos; MCV= Volume Copuscular Médio; MCHC= Concentração de hemoglobina corpuscular médio.

Tabela 2. Parâmetros bioquímicos de fêmeas e machos da linhagem Balb/c.

Parâmetro	Unidade	Fêmeas	Machos
ALT	UI/L	29,72 ± 4,40	54,16 ± 27,80
AST	UI/L	71,32 ± 28,12	89,56 ± 47,73
Ureia	mg/dL	41,48 ± 13,61	31,76 ± 21,08
Creatinina	mg/dL	0,44 ± 0,11	0,76 ± 0,18
FAL	UI/L	2,32 ± 0,85	3,76 ± 2,08

DISCUSSÃO

A avaliação hematológica é uma ferramenta essencial para determinação do perfil fisiológico das linhagens e/ou populações de animais. Além de permitir a criação de valores de referência que reflitam a condição da colônia mantida em cada laboratório [7]. No entanto, estabelecer um intervalo de valores de referência para roedores é dificultoso, pois muitas variáveis devem ser consideradas, como: sexo, idade, variação genética, dieta e condições ambientais em que estes animais são submetidos [3].

O ambiente no qual os roedores são mantidos interfere diretamente no seu metabolismo e, conseqüentemente nos valores hematológico e bioquímico do animal [13]. Em camundongo é comum à presença de eritrócitos imaturos na circulação periférica, em decorrência da ação endócrina do baço

e do fígado em resposta a uma maior necessidade de captação de oxigênio e, visto ao curto tempo de vida dos glóbulos vermelhos [4].

Entre os principais fatores ambientais de influência estão à temperatura, umidade relativa, ventilação, iluminação, ruído, manuseio, alimento, água, patógenos e contato com outros animais [13].

Quando comparados os resultados do presente estudo com os valores expressos na literatura observou-se semelhança para alguns parâmetros hematológicos (RBC, HCT, HGB, PLT, contagem de linfócitos, eosinófilos, monócitos, neutrófilos e basófilos); enquanto outros apresentaram certa divergência (MCV, MCHC e WBC) [9,14,16-18]. Todos os valores hematológicos apresentados neste trabalho encontram-se dentro do intervalo de normalidade definido para a espécie. Acredita-se que a discordância entre os valores de MCV e MCHC

deve-se a presença de glóbulos vermelhos de tamanho variável na circulação periférica, principalmente eritrócitos imaturos, que possuem maior volume celular quando comparados com células vermelhas maduras [4].

Já variações para contagem de leucócitos podem estar relacionadas ao método de contenção e coleta da amostra, visto que a manifestação do estresse pelo animal durante o procedimento promove a liberação de adrenalina, que resulta na mobilização de neutrófilos da medula óssea para a os vasos sanguíneos e, posterior elevação dos valores de neutrófilos e aumento de leucócitos totais [12].

As divergências nos valores hematológicos também podem ser explicadas pelos métodos de quantificação manual ou automático, bem como, pela experiência do investigador [4].

Geralmente, os valores de referência hematológica para camundongos não são obtidos através de uma avaliação individual e sim, da realização de um pool de amostras sanguíneas, o que dificulta a obtenção de valores que revelem verdadeiramente o estado dos animais de experimentação [13].

Para os parâmetros bioquímicos, a concentração de ureia de machos e fêmeas apresentaram valores próximos ao intervalo relatado para camundongos Balb-c, o que indica o funcionamento renal normal dos animais [1]. Entretanto a concentração de ureia deve ser avaliada concomitantemente com os níveis de creatinina. Já que a mesma é filtrada livremente no glomérulo, diferentemente da ureia, o que permite fornecer um resultado mais fidedigno da função renal, além de não ser influenciado pela dieta [14].

Os valores de creatinina obtidos nesse estudo foram superiores aos valores observados por outros autores [9,16]. Porém, sabe-se que a concentração sérica de creatinina varia amplamente visto que está intimamente relacionada com massa muscular, metabolismo muscular e peso corporal de cada indivíduo

que compõem a amostra [11]. Embora divergentes, os resultados da mensuração da creatinina encontram-se inseridos dentro do padrão de normalidade.

A quantificação das enzimas ALT, AST e FAL tem a finalidade de avaliar as funções metabólicas desempenhadas pelos órgãos e tecidos, principalmente a função hepática [17]. Nosso estudo apresentou valores diferentes dos observados por outros autores para a mesma espécie. Essas divergências podem ser justificadas pelas diferentes metodologias aplicadas, quanto ao equipamento e reagentes para dosagens bem como a utilização da análise manual ou automatizada [10]. Fatores adicionais, tais como sexo, idade, linhagem, estresse ambiental, local de coleta e método de contenção, também são fontes de variação em valores bioquímicos [5].

CONCLUSÕES

A determinação de valores de referências para parâmetros bioquímicos e hematológicos para animais de experimentação é de suma importância para a validação de diversos estudos. Os resultados aqui apresentados encontram-se dentro da curva de variação para a espécie camundongo, podendo ser utilizadas como referência para estudos posteriores que utilizem a linhagem Balb/c como modelo.

MANUFACTURERS

¹Alesco Brasil. Monte Mor, SP, Brazil.

²Sigma - Aldrich St. Louis, MO. USA.

³Horiba Instruments Brasil Ltda. São Paulo, SP, Brazil.

⁴Laborclin Produtos Para Laboratórios Ltda. Pinhais, PR, Brazil.

⁵Laborglas Materiais Para Laboratório Ltda. São Paulo, SP, Brazil.

⁶Bioplus Produtos para Laboratório Ltda, São Paulo, SP, Brazil.

⁷Vida Biotecnologia Ltda. Belo Horizonte, MG, Brazil.

Ethical approval. O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética e Bem-Estar Animal (CEUA) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) sob o protocolo 23091.003217/2014-17.

Declaration of interest. Informamos que não há conflitos de interesse entre os autores. O conteúdo aqui apresentado é de responsabilidade única dos autores.

REFERENCES

- 1 Almeida A.S., Faleiros A.C.G., Teixeira D.N.S., Cota U.A. & Chica J.E.L. 2008. Valores de referência de parâmetros bioquímicos no sangue de duas linhagens de camundongos. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 44: 429-432.
- 2 Branco A.C.C., Dinizi M.F.F.M., Almeida R.N., Santos H.B., Oliveira K.M., Ramalho J.A. & Dantas J.G. 2011. Parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos Wistar e camundongos Swiss do Biotério Professor Thomas George. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*. 15: 209-214.
- 3 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2000. *How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory: approved guideline* (CLSI document C28-A2). Wayne: CLSI, 59p.
- 4 Everds N. 2004. Hematology of the mouse. In: Hans Hedrich (Ed). *The Laboratory Mouse*. Amsterdam: Elsevier Academic Press, pp.271-286.
- 5 Fernández I., Peña A., Teso N.D., Pérez V. & Rodríguez- Cuesta J. 2010. Clinical biochemistry parameters in C57BL/6J mice after blood collection from the submandibular vein and retroorbital plexus. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*.49: 202-206.
- 6 Hoff J. 2000. Methods of Blood Collection in the Mouse. *Laboratório Animal*. 29:1-7.
- 7 Lima C.M., Lima A.K., Melo M.G.D., Dória G.A.A., Leite B.L.S., Serafini M.R., Albuquerque-Júnior R.L.C. & Araújo A.A.S. 2014. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. *Scientia Plena*. 10: 1-9.
- 8 Machado C.C. & Zatti R.A. 2015. Animais De Laboratório: O Camundongo. In: *Anais Simpoc*. v.5. (Viçosa, Brasil). pp.169-176.
- 9 Matida E.T., Zancanaro A.E., Restel T.I., Gomes V.M.W., Bazzano T., Mori C.M.C. & Teixeira M.A. 2015. Determinação de parâmetros bioquímicos e hematológicos em camundongos (*Mus musculus*) do biotério central da UFMS. *Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório*. 3: 30-35.
- 10 Melo M.G.D., Dória G.A.A., Serafini M.R. & Araújo A.A.S. 2012. Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. *Scientia Plena*. 8: 1-6.
- 11 Peres L.A.B., Cunha Júnior A.D, Schäfer A.J., Silva A.L., Gaspar A.D., Scarpari D. F., Alves J.B.F., Gerelli Neto R. & Oliveira T.F.T. 2013. Biomarcadores da injúria renal aguda. *Jornal brasileiro de Nefrologia*. 35: 229-236.
- 12 Restel T.I. 2012. Avaliação ponderal, hematológica 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. 72f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.
- 13 Santos E.W., Oliveira D.C., Hastreiter A., Silva G.B., Beltran J.S.O., Tsujita M., Crisma A.R., Neves S.M.P., Fock R.A. & Borelli P. 2016. Hematological and biochemical reference values for C57BL/6, Swiss Webster and BALB/c mice. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 53: 138-145.
- 14 Sodré F.L., Costa J.C.B. & Lima J.C.C. 2007. Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 43: 329-37.
- 15 Spinelli M.O., Cruz R.J., Godoy C.M.S., Junqueira M.S., Motta M.C. & Bortolatto J. 2012. Perfil bioquímico dos animais de laboratório do biotério da Faculdade de Medicina da USP. *Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório*. 1: 76-81.
- 16 Spinelli M.O., Motta M.C., Cruz R.J. & Godoy C.M.S.C. 2014. Reference intervals for hematological parameters of animals bred and kept at the vivarium of the Faculty of Medicine of the State University of São Paulo. *Acta Scientiarum. Health Sciences*. 36: 1-4.
- 17 Thrall M.A. 2007. *Hematologia e bioquímica clínica veterinária*. São Paulo: Roca, 582p.
- 18 Weiss D.J. & Wardrop K.J. 2010. *Schalm's Veterinary Hematology*. 6th edn. Ames: Wiley Blackwell, 1232p.

