

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Estabelecimento de valores de referência para parâmetros hematológicos e bioquímicos e  
avaliação do perfil imunológico de linhagens de camundongos produzidas nos biotérios do  
Centro de Pesquisas René Rachou / FIOCRUZ - Minas e do Centro de Criação de Animais  
de Laboratório / FIOCRUZ

por

FERNANDA TRINDADE MADEIRA ARAÚJO

BELO HORIZONTE  
FEVEREIRO/2012

DISSERTAÇÃO MDIP-CPqRR F.T.M. ARAUJO 2012
---

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Estabelecimento de valores de referência para parâmetros hematológicos e bioquímicos e avaliação do perfil imunológico de linhagens de camundongos produzidas nos biotérios do Centro de Pesquisas René Rachou / FIOCRUZ – Minas e do Centro de Criação de Animais de Laboratório / FIOCRUZ

por

FERNANDA TRINDADE MADEIRA ARAÚJO

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do Título de Mestre em Ciências na área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias.  
Orientação: Dr<sup>a</sup>. Andréa Teixeira de Carvalho  
Coorientação: Dr<sup>a</sup>. Ana Carolina Peixoto Teixeira

BELO HORIZONTE  
FEVEREIRO/2012

Catálogo-na-fonte  
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ  
Biblioteca do CPqRR  
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

A758e  
2012

Araújo, Fernanda Trindade Madeira.

Estabelecimento de valores de referência para parâmetros hematológicos e bioquímicos e avaliação do perfil imunológico de linhagens de camundongos produzidas nos biotérios do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ-Minas e do Centro de Criação de Animais de Laboratório/FIOCRUZ / Fernanda Trindade Madeira Araújo. – Belo Horizonte, 2012.

XXII, 135 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 142 - 157

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Camundongos/imunologia 2. Valores de Referência  
3. Testes Hematológicos/utilização 4.  
Bioquímica/instrumentação I. Título. II. Carvalho, Andréa  
Teixeira de (Orientação). III. Teixeira, Ana Carolina  
Peixoto (Coorientação)

CDD – 22. ed. – 616.027 333

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Estabelecimento de valores de referência para parâmetros hematológicos e bioquímicos e avaliação do perfil imunológico de linhagens de camundongos produzidas nos biotérios do Centro de Pesquisas René Rachou / FIOCRUZ – Minas e do Centro de Criação de Animais de Laboratório / FIOCRUZ

por

FERNANDA TRINDADE MADEIRA ARAÚJO

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dra. Andréa Teixeira de Carvalho (Presidente)

Dra. Vera Maria Peters

Dr. Marco Antônio Silva Campos

Suplente: Dr. Edward José de Oliveira

Dissertação defendida e aprovada em: 29/02/2012

**“No semblante de um animal que não fala, há todo um discurso que somente um espírito sábio pode realmente entender.” (Mahatma Gandhi)**

**Dedico este trabalho a todas as pessoas que contribuem para o fortalecimento de uma  
Ciência consciente com o bem - estar dos animais de laboratório.**

## **COLABORADORES**

### **Centro de Pesquisas René Rachou / FIOCRUZ - Minas**

Dr. Márcio Sobreira Silva Araújo – Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração

Dr. Olindo Assis Martins Filho – Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração

Dr<sup>a</sup>.Vanessa Peruhype Magalhães Pascoal – Laboratório de Pesquisas Clínicas

### **Centro de Criação de Animais de Laboratório / FIOCRUZ**

Me. Cléber Hooper da Silva – Serviço de Controle de Qualidade Animal

### **Instituto de Ciências Biológicas / Universidade Federal de Minas Gerais**

Dr<sup>a</sup>. Deborah Aparecida Negrão-Corrêa – Departamento de Parasitologia

## **Agradecimentos**

Primeiramente a Deus, por ter possibilitado a conquista de mais este sonho;

À Dr<sup>a</sup>. Andréa Teixeira de Carvalho por ter aceitado e acreditado na proposta de trabalharmos juntas em favor da Ciência de Animais de Laboratório e ainda, pelo exemplo profissional;

À Dr<sup>a</sup>. Ana Carolina Peixoto Teixeira pelo incentivo constante em minha carreira profissional e pela amizade construída nestes 5 anos;

À mais nova amiga, Dr<sup>a</sup>.Vanessa Peruhype Magalhães Pascoal, pelos ensinamentos em análises clínicas e pela disponibilidade constante;

Ao Dr. Márcio Sobreira Silva Araújo pelos ensinamentos e auxílio em imunofenotipagem;

Aos colaboradores Dr. Olindo Assis Martins Filho, Cléber Hooper da Silva e Dr<sup>a</sup>. Deborah Aparecida Negrão-Corrêa pela fundamental contribuição neste trabalho;

Aos grandiosos animais que possibilitaram a realização deste trabalho em busca de uma melhoria contínua do biotério e da experimentação animal no CPqRR;

À toda equipe do Biotério do CPqRR, especialmente ao Wanderley, Gildo, Douglas, Kleiton e Kátia por tornarem possível a execução deste trabalho;

Ao Dr.Omar pelo carinho e apoio constante em minha carreira de bioterista;

À equipe do CECAL / FIOCRUZ pelo envio dos animais para realização dos experimentos;

Aos órgãos financiadores, pelo apoio na realização desse trabalho;

Ao CPqRR por tornar possível o ingresso na pós - graduação;

À Biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta dissertação, também pela catalogação e normalização da mesma;

À toda equipe do LBDM pela receptividade e pelo acolhimento. Agradeço especialmente ao Renato Abdala e Fabiana Paixão pelo auxílio em hematoscopia e à Salvina Campos pelo auxílio em análises clínicas e imunofenotipagem;

Às queridas secretárias Clari, Sandrinha e Maísa por todo auxílio;

Ao Clóves Asclânio pelo treinamento e auxílio em bioquímica;

Às estagiárias Marcilene e Rafaelle pela contribuição na realização deste trabalho;

À equipe da Labtest Diagnóstica pela grande ajuda por meio do 0800 nos momentos mais difíceis das análises bioquímicas;

À Labshopping pela doação dos controles hematológicos e pela eficiência dos serviços prestados;

Aos amigos da pós-graduação extremamente especiais nesta jornada, Raquel, Antônio, Carol e Flávio, por proporcionarem momentos de muita alegria e pelo companheirismo;

Ao meu marido Fabrício por todo amor, motivação, cumplicidade, dedicação e ainda, por permitir que eu faça parte da sua vida;

À querida Vó Naza pelas vibrações de amor, carinho incomparável e por estar sempre presente, minha eterna gratidão!

Aos meus pais Ivanete e Paulo, verdadeiros anjos protetores, pelo amor incondicional e por propiciarem uma caminhada de tantas conquistas e alegrias;

Ao meu querido irmão Paulinho, grande físico, referência como pesquisador e que a todo momento me inspira a ser sempre melhor no meio científico;

À minha querida irmã Amanda por toda amizade e carinho;

A todos os amigos por entenderem minha ausência em determinados momentos e por toda a torcida durante esta trajetória.

**SUPORTE FINANCEIRO:**

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CPqRR/FIOCRUZ: Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz

FAPEMIG: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Rede Mineira de Bioterismo

## Sumário

<b>Lista de Figuras</b> .....	XIII
<b>Lista de Tabelas</b> .....	XVI
<b>Lista de Abreviaturas e Símbolos</b> .....	XVIII
<b>Resumo</b> .....	XXI
<b>Abstract</b> .....	XXII
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	23
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	27
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	28
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	28
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	29
<b>3.1 Animais de Laboratório</b> .....	30
3.1.1 <i>Classificação genética</i> .....	31
3.1.2 <i>Classificação sanitária</i> .....	31
3.1.3 <i>Padronização genética e sanitária</i> .....	32
3.1.4 <i>Monitoramento sanitário</i> .....	33
<b>3.2 Caracterização hematológica, bioquímica e imunológica</b> .....	34
<b>3.3 Valores de referência</b> .....	35
<b>3.4 O sangue e seus componentes</b> .....	36
3.4.1 <i>Hematologia</i> .....	36
3.4.1.1 <i>Série vermelha</i> .....	37
3.4.1.2 <i>Série branca</i> .....	38
3.4.1.3 <i>Série plaquetária</i> .....	42
3.4.2 <i>Bioquímica</i> .....	42
3.4.3 <i>Imunologia</i> .....	44
<b>3.5 Considerações pré - analíticas e analíticas</b> .....	45
<b>3.6 Coleta de sangue</b> .....	47
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	49
<b>4.1 Monitoramento sanitário</b> .....	50
<b>4.2 Animais</b> .....	52
4.2.1 <i>Seleção das linhagens</i> .....	52
4.2.2 <i>Tamanho da amostra</i> .....	52
4.2.3 <i>Animais CPqRR</i> .....	53
4.2.4 <i>Animais CECAL</i> .....	53

4.3 Coleta de sangue .....	55
4.4 Determinação de parâmetros hematológicos .....	55
4.4.1 Contagem diferencial de leucócitos por microscopia ótica .....	56
4.5 Determinação de parâmetros bioquímicos .....	56
4.6 Avaliação de parâmetros imunológicos .....	59
4.7 Considerações éticas .....	60
4.8 Análise estatística dos dados .....	61
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>62</b>
5.1 Determinação de parâmetros hematológicos .....	63
5.2 Determinação de parâmetros bioquímicos .....	84
5.3 Avaliação de parâmetros imunológicos .....	94
5.4 Estabelecimento de valores de referência para parâmetros hematológicos e bioquímicos .....	101
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>105</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>118</b>
<b>8 ANEXOS .....</b>	<b>120</b>
8.1 Monitoramento sanitário dos animais do biotério do CPqRR .....	121
8.2 Monitoramento sanitário dos animais do biotério do CECAL .....	130
8.3 Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA / FIOCRUZ) .....	136
8.4 Aprovação do Comitê Interno de Biossegurança do CPqRR .....	140
<b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>142</b>

## Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> Fatores externos que interferem no equilíbrio fisiológico, biológico e comportamental de camundongos .....	33
<b>Figura 2:</b> Esfregaço sanguíneo de rato saudável. Eritrócitos, plaquetas, neutrófilos e pequeno linfócito.....	38
<b>Figura 3:</b> Esfregaço sanguíneo de camundongo saudável. Linfócitos e plaquetas agregados	38
<b>Figura 4:</b> Esfregaço sanguíneo de camundongo saudável. Monócito .....	40
<b>Figura 5:</b> Esfregaço sanguíneo de rato saudável. Eosinófilo .....	41
<b>Figura 6:</b> Esfregaço sanguíneo de rato saudável. Basófilo.....	42
<b>Figura 7:</b> Determinação de hemoglobina (HGB) em camundongos fêmeas (F) e machos (M) das linhagens Swiss webster (F=22; M=22), BALB/c (F=21; M=21), C57BL/6 (F=21; M=21) e $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$ (F=19; M=19) provenientes do CPqRR e CECAL .....	64
<b>Figura 8:</b> Determinação de eritrócitos (RBC) em camundongos fêmeas (F) e machos (M) das linhagens Swiss webster (F=22; M=22), BALB/c (F=21; M=21), C57BL/6 (F=21; M=21) e $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$ (F=19; M=19) provenientes do CPqRR e CECAL.....	65
<b>Figura 9:</b> Determinação de hematócrito (HCT) em camundongos fêmeas (F) e machos (M) das linhagens Swiss webster (F=22; M=22), BALB/c (F=21; M=21), C57BL/6 (F=21; M=21) e $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$ (F=19; M=19) provenientes do CPqRR e CECAL .....	66
<b>Figura 10:</b> Determinação do Volume Corpuscular Médio (VCM) em camundongos fêmeas (F) e machos (M) das linhagens Swiss webster (F=22; M=22), BALB/c (F=21; M=21), C57BL/6 (F=21; M=21) e $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$ (F=19; M=19) provenientes do CPqRR e CECAL... ..	67
<b>Figura 11:</b> Determinação de Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) em camundongos fêmeas (F) e machos (M) das linhagens Swiss webster (F=22; M=22), BALB/c (F=21; M=21), C57BL/6 (F=21; M=21) e $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$ (F=19; M=19) provenientes do CPqRR e CECAL.. ..	68
<b>Figura 12:</b> Determinação da Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) em camundongos fêmeas (F) e machos (M) das linhagens Swiss webster (F=22; M=22), BALB/c (F=21; M=21), C57BL/6 (F=21; M=21) e $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$ (F=19; M=19) provenientes do CPqRR e CECAL .....	70
<b>Figura 13:</b> Determinação da contagem global de leucócitos (WBC) em camundongos fêmeas (F) e machos (M) das linhagens Swiss webster (F=22; M=22), BALB/c (F=21; M=21),	

C57BL/6 (F=21; M=21) e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  (F=19; M=19) provenientes do CPqRR e CECAL ..... 71

**Figura 14:** Determinação do percentual de linfócitos em camundongos fêmeas (F) e machos (M) das linhagens Swiss webster (F=22; M=22), BALB/c (F=21; M=21), C57BL/6 (F=21; M=21) e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  (F=19; M=19) provenientes do CPqRR e CECAL ..... 72

**Figura 15:** Determinação da contagem de linfócitos em camundongos fêmeas (F) e machos (M) das linhagens Swiss webster (F=22; M=22), BALB/c (F=21; M=21), C57BL/6 (F=21; M=21) e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  (F=19; M=19) provenientes do CPqRR e CECAL ..... 73

**Figura 16:** Determinação do percentual de neutrófilos em camundongos fêmeas (F) e machos (M) das linhagens Swiss webster (F=22; M=22), BALB/c (F=21; M=21), C57BL/6 (F=21; M=21) e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  (F=19; M=19) provenientes do CPqRR e CECAL ..... 74

**Figura 17:** Determinação da contagem de neutrófilos em camundongos fêmeas (F) e machos (M) das linhagens Swiss webster (F=22; M=22), BALB/c (F=21; M=21), C57BL/6 (F=21; M=21) e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  (F=19; M=19) provenientes do CPqRR e CECAL ..... 75

**Figura 18:** Determinação do percentual de monócitos em camundongos fêmeas (F) e machos (M) das linhagens Swiss webster (F=22; M=22), BALB/c (F=21; M=21), C57BL/6 (F=21; M=21) e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  (F=19; M=19) provenientes do CPqRR e CECAL ..... 76

**Figura 19:** Determinação da contagem de monócitos em camundongos fêmeas (F) e machos (M) das linhagens Swiss webster (F=22; M=22), BALB/c (F=21; M=21), C57BL/6 (F=21; M=21) e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  (F=19; M=19) provenientes do CPqRR e CECAL ..... 77

**Figura 20:** Determinação do percentual de eosinófilos em camundongos fêmeas (F) e machos (M) das linhagens Swiss webster (F=22; M=22), BALB/c (F=21; M=21), C57BL/6 (F=21; M=21) e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  (F=19; M=19) provenientes do CPqRR e CECAL ..... 78

**Figura 21:** Determinação da contagem de eosinófilos em camundongos fêmeas (F) e machos (M) das linhagens Swiss webster (F=22; M=22), BALB/c (F=21; M=21), C57BL/6 (F=21; M=21) e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  (F=19; M=19) provenientes do CPqRR e CECAL ..... 79

**Figura 22:** Determinação da contagem de plaquetas (PLT) em camundongos fêmeas (F) e machos (M) das linhagens Swiss webster (F=22; M=22), BALB/c (F=21; M=21), C57BL/6 (F=21; M=21) e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  (F=19; M=19) provenientes do CPqRR e CECAL ..... 80

**Figura 23:** Determinação dos níveis séricos de uréia em camundongos fêmeas (F) e machos (M) das linhagens Swiss webster (F=22; M=22), BALB/c (F=21; M=21), C57BL/6 (F=21; M=21) e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  (F=19; M=19) provenientes do CPqRR e CECAL ..... 85

**Figura 24:** Determinação dos níveis séricos de creatinina em camundongos fêmeas (F) e machos (M) das linhagens Swiss webster (F=22; M=22), BALB/c (F=21; M=21), C57BL/6 (F=21; M=21) e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  (F=19; M=19) provenientes do CPqRR e CECAL ..... 87

**Figura 25:** Determinação dos níveis séricos de AST/TGO em camundongos fêmeas (F) e machos (M) das linhagens Swiss webster (F=22; M=22), BALB/c (F=21; M=21), C57BL/6 (F=21; M=21) e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  (F=19; M=19) provenientes do CPqRR e CECAL ..... 88

**Figura 26:** Determinação dos níveis séricos de ALT/TGP em camundongos fêmeas (F) e machos (M) das linhagens Swiss webster (F=22; M=22), BALB/c (F=21; M=21), C57BL/6 (F=21; M=21) e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  (F=19; M=19) provenientes do CPqRR e CECAL ..... 89

**Figura 27:** Determinação dos níveis séricos de fosfatase alcalina em camundongos fêmeas (F) e machos (M) das linhagens Swiss webster (F=22; M=22), BALB/c (F=21; M=21), C57BL/6 (F=21; M=21) e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  (F=19; M=19) provenientes do CPqRR e CECAL ..... 90

**Figura 28:** Determinação dos níveis séricos de proteínas totais em camundongos fêmeas (F) e machos (M) das linhagens Swiss webster (F=22; M=22), BALB/c (F=21; M=21), C57BL/6 (F=21; M=21) e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  (F=19; M=19) provenientes do CPqRR e CECAL ..... 91

**Figura 29:** Avaliação do perfil de linfócitos T ( $\text{CD3}^+$ ) em camundongos fêmeas (F) e machos (M) das linhagens Swiss webster (F=5; M=5), BALB/c (F=5; M=5), C57BL/6 (F=5; M=5) e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  (F=5; M=5) provenientes do CPqRR e CECAL ..... 95

**Figura 30:** Avaliação do perfil de linfócitos T auxiliares ( $\text{CD4}^+$ ) em camundongos fêmeas (F) e machos (M) das linhagens Swiss webster (F=5; M=5), BALB/c (F=5; M=5), C57BL/6 (F=5; M=5) e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  (F=5; M=5) provenientes do CPqRR e CECAL ..... 96

**Figura 31:** Avaliação do perfil de linfócitos T citotóxicos/supressores ( $\text{CD8}^+$ ) em camundongos fêmeas (F) e machos (M) das linhagens Swiss webster (F=5; M=5), BALB/c (F=5; M=5), C57BL/6 (F=5; M=5) e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  (F=5; M=5) provenientes do CPqRR e CECAL ..... 97

**Figura 32:** Avaliação do perfil de linfócitos B ( $\text{CD19}^+$ ) em camundongos fêmeas (F) e machos (M) das linhagens Swiss webster (F=5; M=5), BALB/c (F=5; M=5), C57BL/6 (F=5; M=5) e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  (F=5; M=5) provenientes do CPqRR e CECAL ..... 98

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Principais fatores que afetam resultados experimentais.....	46
<b>Tabela 2:</b> Principais procedimentos de coleta de sangue em camundongos.....	47
<b>Tabela 3:</b> Principais agentes pesquisados, amostras e métodos utilizados no monitoramento sanitário do CECAL.....	51
<b>Tabela 4:</b> Principais diferenças existentes entre os procedimentos / barreiras sanitárias adotados nos biotérios do CPqRR e CECAL.....	54
<b>Tabela 5:</b> Relação de químicas, metodologia aplicada, tipo de reação e comprimento de onda (reagentes Labtest).....	58
<b>Tabela 6:</b> Anticorpos utilizados para imunofenotipagem de linfócitos circulantes.....	60
<b>Tabela 7:</b> Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) encontradas na determinação de HGB, RBC, HCT, VCM, HCM, CHCM e PLT quando comparados animais de sexos distintos em uma mesma linhagem e biotério.....	81
<b>Tabela 8:</b> Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) encontradas na determinação da contagem global de WBC, número percentual e absoluto de LINF, NEUT, MONO e EOSI quando comparados animais de sexos distintos em uma mesma linhagem e biotério.....	81
<b>Tabela 9:</b> Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) encontradas na determinação de HGB, RBC, HCT, VCM, HCM, CHCM e PLT quando comparados animais do mesmo sexo e linhagem em biotérios distintos.....	82
<b>Tabela 10:</b> Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) encontradas na determinação da contagem global de WBC, número percentual e absoluto de LINF, NEUT, MONO e EOSI quando comparados animais do mesmo sexo e linhagem em biotérios distintos.....	83
<b>Tabela 11:</b> Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) encontradas na determinação de HGB, RBC, HCT, VCM, HCM, CHCM e PLT quando comparados animais do mesmo sexo e biotério e linhagens distintas.....	83
<b>Tabela 12:</b> Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) encontradas na determinação da contagem global de WBC, número percentual e absoluto de LINF, NEUT, MONO e EOSI quando comparados animais do mesmo sexo e biotério e linhagens distintas.....	84
<b>Tabela 13:</b> Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) encontradas na determinação dos níveis séricos de URE, CRE, AST/TGO, ALT/TGP, FA e PT quando comparados animais de sexos distintos em uma mesma linhagem e biotério.....	92
<b>Tabela 14:</b> Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) encontradas na determinação dos níveis séricos de URE, CRE, AST/TGO, ALT/TGP, FA e PT quando comparados	

animais do mesmo sexo e linhagem em biotérios distintos.....	93
<b>Tabela 15:</b> Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) encontradas na determinação dos níveis séricos de URE, CRE, AST/TGO, ALT/TGP, FA e PT quando comparados animais do mesmo sexo e biotério e linhagens distintas.....	93
<b>Tabela 16:</b> Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) encontradas na determinação dos perfis de linfócitos T e de suas subpopulações $CD4^+$ e $CD8^+$ e linfócitos B ( $CD19^+$ ) quando comparados animais de sexos distintos em uma mesma linhagem e biotério.....	99
<b>Tabela 17:</b> Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) encontradas na determinação dos perfis de linfócitos T e de suas subpopulações $CD4^+$ e $CD8^+$ e linfócitos B ( $CD19^+$ ) quando comparados animais do mesmo sexo e linhagem em biotérios distintos.....	99
<b>Tabela 18:</b> Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) encontradas na determinação dos perfis de linfócitos T e de suas subpopulações $CD4^+$ e $CD8^+$ e linfócitos B ( $CD19^+$ ) quando comparados animais do mesmo sexo e biotério e linhagens distintas.....	100
<b>Tabela 19:</b> Média, desvio - padrão e valores de referência de parâmetros da série vermelha e plaquetas de fêmeas e machos de linhagens de camundongos produzidas nos biotérios do CPqRR e CECAL.....	102
<b>Tabela 20:</b> Média, desvio - padrão e valores de referência de parâmetros da série branca de fêmeas e machos de linhagens de camundongos produzidas nos biotérios do CPqRR e CECAL.....	103
<b>Tabela 21:</b> Média, desvio - padrão e valores de referência de parâmetros bioquímicos de fêmeas e machos de linhagens de camundongos produzidas nos biotérios do CPqRR e CECAL.....	104

## Lista de Abreviaturas e Símbolos

**ACLAM** - *American College of Laboratory Animal Medicine* - Colégio Americano de Medicina de Animais de Laboratório.

**ALT/TGP** - Alanina aminotransferase / Transaminase glutâmico oxalacética.

**AST/TGO** - Aspartato aminotransferase / Transaminase glutâmico pirúvica.

**BASO** - Basófilos.

**BIOT** - Biotério de Produção.

**BPLs** - Boas Práticas de Laboratório.

**CD3** - Marcador de superfície para população de linfócitos T.

**CD4** - Co-receptor para moléculas do complexo de histocompatibilidade principal de classe II. Expresso em subgrupos de timócitos, linfócitos T, monócitos e macrófagos.

**CD8** - Co-receptor para MHC de classe I. Expresso em subgrupos de timócitos e linfócitos T citotóxicos e / ou supressores.

**CD19** - Marcador de superfície para população de linfócitos B.

**CECAL** - Centro de Criação de Animais de Laboratório.

**CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais.

**CHCM** - Concentração da hemoglobina corpuscular média.

**CLSI** - Instituto de Padronização Clínica e Laboratorial.

**CPqRR** - Centro de Pesquisas René Rachou.

**CRE** - Creatinina.

**EOSI** - Eosinófilos.

**EDTA** - Ácido etilenodiaminotetracético.

**ELISA** - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* – Teste imunoenzimático.

**EUA** - Estados Unidos da América.

**FA** - Fosfatase alcalina.

**FACS** - *Fluorescence Activated Cell Sorter* - Separador de células ativado por fluorescência.

**FELASA** - *Federation of Laboratory Animal Science Associations* - Federação das Associações em Ciência de Animais de Laboratório.

**FITC** - Isotiocianato de fluorescência.

**FL** - Fluorescência.

**FLS** - *Facs Lysing Solution* - Solução lisante de eritrócitos para imunofenotipagem.

**HGB** - Hemoglobina.

**HCM** - Hemoglobina corpuscular média.

**HCT** - Hematócrito.

**IFCC** - Federação Internacional de Química Clínica.

**Ifn- $\gamma$**  - Interferon - gama.

**IG** - Imunoglobulina.

**ILAR** - *Institute Laboratory Animal Research* - Instituto de Pesquisa em Animais de Laboratório.

**LBDM** - Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração.

**LINF** - Linfócitos.

**MONO** - Monócitos.

**NEUT** - Neutrófilos.

**OMS** - Organização Mundial de Saúde.

**PE** - Ficoeritrina.

**PerCP** - Complexo proteína piridina clorofila.

**PLT** - Plaquetas.

**POP** - Procedimento Operacional Padrão.

**PT** - Proteínas totais.

**RBC** - Células vermelhas do sangue.

**SCQA** - Serviço de Controle de Qualidade Animal.

**SOPF** - *Specific Opportunist Patogen Free* - Livres de agentes patogênicos e oportunistas especificados.

**SPF** - *Specific Patogen Free* - Livres de patógenos especificados.

**TCR** - *T - Cell Receptors* - Receptores de células T.

**UFMG** - Universidade Federal de Minas Gerais.

**URE** - Uréia.

**VAF** - *Virus Antibody Free* - Livres de anticorpos contra vírus.

**VCM** - Volume corpuscular médio.

**WBC** - Células brancas do sangue.

## Resumo

A sensibilidade e a precisão dos resultados em pesquisas dependem do uso de animais padronizados para diversos parâmetros como pré-requisito importante para a reprodutibilidade em experimentação animal. Assim, a determinação destes parâmetros em valores de referência 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. Neste estudo foram estabelecidos valores de referência para parâmetros hematológicos e bioquímicos e avaliado o perfil imunológico de linhagens de camundongos produzidas nos biotérios do Centro de Pesquisas René Rachou / FIOCRUZ-Minas e Centro de Criação de Animais de Laboratório / FIOCRUZ. Foram utilizados 332 camundongos, com idade entre 6 e 8 semanas, das linhagens Swiss webster, BALB/c, C57BL/6 e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  *knockout*. Após a anestesia dos animais foi realizado o procedimento de punção cardíaca para determinação de parâmetros hematológicos (hemoglobina, eritrócitos, hematócrito, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média, concentração da hemoglobina corpuscular média, global e diferencial de leucócitos e plaquetas), bioquímicos (uréia, creatinina, aspartato transaminase, alanina transaminase, fosfatase alcalina e proteínas totais) e imunológicos (linfócitos T e subpopulações  $\text{CD4}^+$  e  $\text{CD8}^+$  e linfócitos B). A determinação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos e a avaliação dos perfis imunológicos foram realizadas por meio do cálculo da mediana, média global e dos valores mínimos e máximos obtidos. Os testes Mann-Whitney e Kruskal-Wallis foram utilizados para comparações entre os grupos e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para um valor de  $p < 0,05$ . Os resultados deste trabalho demonstraram existir diferenças estatisticamente significativas no que diz respeito ao sexo, biotério e linhagem na maioria dos parâmetros analisados. Contudo, foi possível perceber uma grande similaridade dos perfis imunológicos, com exceção da comparação feita entre as linhagens. De uma forma geral, os machos apresentaram valores superiores aos das fêmeas em todas as linhagens. Além disso, a linhagem Swiss webster apresentou os maiores valores de referência, evidenciando assim a variabilidade genética destes animais, enquanto que C57BL/6 apresentou as maiores diferenças quando comparada com as outras linhagens. Neste contexto, os resultados obtidos fortalecem a necessidade de estabelecimento de valores de referência para cada biotério / instituição, pois está evidenciado que o padrão sanitário dos animais interfere diretamente na caracterização de diferentes parâmetros. Adicionalmente, a caracterização desses parâmetros por sexo, idade e linhagem permite uma correta validação dos experimentos ao mesmo tempo em que auxilia na promoção do sucesso da criação destes animais em cativeiro.

## Abstract

The sensitivity and accuracy of experimental results in research projects involving murine models rely on the use of animals that exhibiting standardized laboratorial parameters as important prerequisites for the data reproducibility in animal experimentation. Thus, the determination of each parameters and its use as reference values in a population of specimens kept in captivity is an essential tool to assess their health status as well as to detect potential diseases even before any symptoms manifest. The current study has established reference values for hematological and biochemical parameters and has still evaluated immunological profile of mice strains produced in the animal houses at Research Center René Rachou / FIOCRUZ-Minas and Breeding Center of Laboratory Animals / FIOCRUZ. We studied 332 mice belong to the Swiss webster, BALB/c, C57BL/6 and Ifn- $\gamma$  knockout strains, aged from 6 to 8 weeks. After the cardiac puncture of the animals, hematological parameters (hemoglobin, erythrocytes, hematocrit, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin, mean corpuscular hemoglobin concentration, platelets, global and differential leukocyte count, biochemical (urea, creatinine, aspartate transaminase, alanine transaminase, alkaline phosphatase and total protein) and immunological (T lymphocyte and subpopulations CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> and B lymphocytes) were determined. The assessment of these features were performed by evaluating the median, global mean and minimum and maximum values for each analyte. Comparisons among distinct groups were performed by Kruskal-Wallis and Mann-Whitney Tests and the values were considered significant when  $p < 0,05$ . These significance differences were found according to animal gender, animal house and strain in most parameters. However, regarding the immunological profile, in most cases, it was possible to observe a great similarity between the groups with exception presented when this profile was compared among strains. In general, for all the strains, males showed higher values than females. In addition, the Swiss Webster strain showed a higher range for the reference values, revealing the genetic variability of these animals. The C57BL/6 strain showed the greatest differences when compared with the additional strains. In this context, the results obtained support the need to establish reference values for each animal house / institution, since it has been evidenced that the health standard of the animals directly interferes in the characterization of different parameters. Additionally, the characterization of hematological, biochemical and immunological features by sex, age and strain might allow us to a correct validation of the experiments as well as help us in promoting the successful creation of these animals in captivity.

## **1 INTRODUÇÃO**

A pesquisa científica e as atividades relacionadas ao ensino, desenvolvimento tecnológico, técnicas cirúrgicas, diagnóstico de enfermidades, produção e controle de qualidade de imunobiológicos e fármacos requerem animais de laboratório como uma ferramenta para avanços na compreensão da vida, na prevenção e no tratamento de doenças. Para a continuidade do progresso dessas áreas, beneficiando a saúde humana e animal, é de fundamental importância a experimentação animal, uma vez que ainda não existem disponíveis sistemas alternativos que permitam a substituição completa dos animais (Majerowicz, 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). A escolha por esta espécie não é aleatória, características como tamanho, adaptação ao cativeiro, fácil manejo e manutenção, baixo custo em relação a outras espécies, alta taxa de reprodução e curto período de gestação são responsáveis por esta preferência (De Luca et al, 1996). Além disso, apresentam gerações de curto período, grande número de linhagens isogênicas disponíveis, mapeamento genético completo e propriedades imunológicas bem conhecidas (Zhou & Hansson, 2004; Mazzaccara et al, 2008).

Nas últimas décadas, com o avanço da manipulação de células-tronco embrionárias murinas e a consequente criação de modelos geneticamente modificados como os *knockouts*, vem sendo possível entender os mecanismos de muitas doenças humanas e ainda alterar a expressão do gene *in vivo* de diversas maneiras a fim de explorar novas possibilidades no tratamento de doenças (Zhou & Hansson, 2004; Mazzaccara et al, 2008).

Em pesquisas experimentais, validade e reprodutibilidade são influenciadas por três variáveis importantes, o padrão genético, sanitário e de ambiente (Regh & Toth, 1998; Ferreira et al, 2005). Como consequência, a sensibilidade e a precisão desses resultados dependem do uso de animais de laboratório padronizados, produzidos em condições de ambiente controlado e submetidos a um programa regular periódico de monitorização genética, de saúde e ambiental (Cassel et al, 1981; Melby Jr. & Balk, 1983; Pakes et al, 1984; Bhatt et al, 1986; Lussier, 1988; Baker, 1998; Weisbroth et al, 1998).

A *Federation of Laboratory Animal Science Associations* (FELASA) (2002) preconiza que animais padronizados para diversos parâmetros são pré-requisitos importantes para a reprodutibilidade em experimentação animal. Por esta razão, é de vital importância que cada instituição estabeleça o monitoramento da saúde de seus animais. Neste contexto, embora a maioria das infecções de camundongos seja subclínica, ou seja, sem a manifestação de sinais,

elas são extremamente relevantes visto a capacidade desses agentes em interferir na fisiologia dos animais, promovendo alterações da resposta imune, dos parâmetros histológicos, nutricionais, bioquímicos e hematológicos, além de influenciarem na susceptibilidade a outros agentes infecciosos (Hsu, 1980; Fujioka et al, 1985; Bhagwant & Johri, 1986; Buret et al, 1990; Lubcke et al, 1992; Pinto et al, 1997; Bugarski et al, 2005).

Considerando a importância dos camundongos na pesquisa biomédica atual, é surpreendente como pouco se sabe sobre seu fenótipo hematológico, bioquímico e imunológico (Mitruka & Rawnsley, 1979; Frith et al, 1978; Wolford et al, 1986; Loeb & Quimby, 1999; Hough et al, 2002; Schnell et al, 2002; Zhou & Hansson, 2004). Embora o estabelecimento de valores de referência seja problemático, pois somente são considerados animais normais aqueles que estão dentro de certa distribuição e os resultados encontrados fora dela são usados para identificar processos de doença, é essencial a caracterização correta destes valores para parâmetros hematológicos, bioquímicos e imunológicos em cada instituição (Brockus et al, 2005).

Ao estabelecer valores de referência para qualquer parâmetro em humanos, algumas características devem ser consideradas, tais como idade, sexo, raça, fatores ambientais, estado nutricional, grau de atividade física, período do ciclo menstrual, uso de medicamentos, existência de doença crônica, etc (Andriolo, 2008). Com relação aos roedores, eles podem exibir variações dos parâmetros hematológicos, bioquímicos e imunológicos relacionadas ao sexo, linhagem e genótipo, podendo ser influenciados pela idade, dieta, manejo, ambiente, entre outros fatores. Por essa razão, 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, bioquímicos e imunológicos 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. Além disso, é de grande relevância no acompanhamento de tratamentos, fornecendo dados que possibilitam avaliar a resposta terapêutica (Troiano et al, 2008).

Desta forma, o propósito deste estudo foi estabelecer valores de referência hematológicos e bioquímicos de linhagens de camundongos produzidas nos biotérios do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR) / FIOCRUZ – Minas e do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) / FIOCRUZ. Adicionalmente, foi possível avaliar os

parâmetros imunológicos destas linhagens a fim de se conhecer características peculiares às mesmas. Assim, este projeto tornou-se relevante por caracterizar os valores dos parâmetros que serão utilizados como referência dentro das condições convencionais controladas do biotério do CPqRR. Além disso, este estudo se consistirá em importante ferramenta para a triagem e diagnóstico das condições de saúde e doença das colônias de camundongos.

## **2 OBJETIVOS**

## **2.1 Objetivo Geral**

Estabelecer valores de referência para parâmetros hematológicos e bioquímicos e avaliar o perfil imunológico de camundongos das linhagens Swiss webster, BALB/c, C57BL/6, Interferon gama *knockout* (B6.129.If $\gamma$ <sup>(-/-)</sup>) produzidos no biotério do CPqRR / FIOCRUZ - Minas e de animais livres de patógenos especificados (SPF) provenientes do CECAL / FIOCRUZ.

## **2.2 Objetivos Específicos**

Em camundongos fêmeas e machos das linhagens estudadas pretende-se:

Determinar a concentração de hemoglobina, contagem de eritrócitos, hematócrito, índices hematimétricos e número de plaquetas presentes no sangue;

Determinar a contagem global de leucócitos, número percentual e absoluto de linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos presentes no sangue;

Determinar o perfil sérico dos parâmetros bioquímicos uréia (URE), creatinina (CRE), aspartato aminotransferase (AST/TGO), alanina aminotransferase (ALT/TGP), fosfatase alcalina (FA) e proteínas totais (PT) presentes no sangue;

Avaliar a frequência percentual de linfócitos T e de suas subpopulações T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e linfócitos B (CD19<sup>+</sup>) presentes no sangue.

### **3 REVISÃO DA LITERATURA**

### **3.1 Animais de Laboratório**

Os animais de laboratório são utilizados em pesquisas envolvendo as mais diversas áreas da pesquisa biomédica, sendo imprescindíveis para o desenvolvimento das ciências biológicas e da saúde e assim, tendo grande relevância para as medicinas humana e veterinária (Pakes, 1990; De Lucca et al, 1996; Andrade et al, 2002; Majerowicz, 2008; Salgado, 2010).

A aplicação de modelos animais é tão diversa quanto as áreas de investigação existentes (Svendesen & Hau, 1994). Para a obtenção de resultados experimentais confiáveis, a escolha do modelo animal deve ser feita de acordo com o protocolo experimental, adotando espécies disponibilizadas com qualidade adequada e em menor número possível (Mann et al, 1991; Botting & Morrison, 1997; Gilioli, 2003; Ferreira et al, 2005).

Neste contexto, Russel & Burch (1959) sintetizaram em três palavras o Princípio Humanitário da Experimentação Animal, onde se deve utilizar o menor número possível de animais (Reduction), substituir o modelo animal por modelos alternativos (Replacement) e aprimorar as técnicas de pesquisa visando minimizar o sofrimento do animal (Refinement) (Andrade et al, 2002; National Research Council, 2008). A pesquisa animal conduzida com ética e responsabilidade oferece sempre expectativas para o desenvolvimento de novos métodos de prevenção, tratamento, cura e controle de doenças, do sofrimento e da dor (*American College of Laboratory Animal Medicine - ACLAM, 2004*).

No século passado, espécies de roedores como ratos e camundongos começaram a ser utilizados de forma considerável como modelos a serem adotados na pesquisa devido à facilidade de acompanhamento das diferentes fases de seu desenvolvimento (De Lucca et al, 1996; Gilioli, 2003). Atualmente, o camundongo é o animal mais amplamente utilizado para fins de ensino e pesquisa (Andersen et al, 2004). A escolha por esta espécie se justifica pelo fato de serem mamíferos pequenos, prolíferos, de manuseio e manutenção fáceis, com curtas gerações e proporcionando assim, um custo reduzido na experimentação animal e um maior número de animais disponíveis (De Lucca et al, 1996; Mazzaccara et al, 2008; Lapchik et al, 2010; Weiss & Wardrop, 2010). Desde então, o camundongo tem desempenhado um papel fundamental na genética de mamíferos e na pesquisa biomédica. Além disso, a capacidade de se adicionar e alterar seletivamente o genoma deste roedor, aumentou seu poder como uma ferramenta para o entendimento das bases genéticas em processos de saúde e doenças humanas. Camundongos isogênicos e mutantes frequentemente possuem síndromes similares às doenças humanas hereditárias devido à proximidade metabólica e anatômica interna com

os seres humanos (Hedrich, 2004).

### **3.1.1 Classificação genética**

Com relação à classificação genética de camundongos, podemos dividi-los em dois grandes grupos: não-consanguíneos (heterogênicos ou *outbred*), caracterizados como linhagens geneticamente heterozigotas para muitos pares de alelos e criadas em sistemas de cruzamento randômico (Poiley, 1960; Chia et al, 2005), como por exemplo, Swiss webster, e os denominados consanguíneos (isogênicos ou *inbred*), mantidos por sistema de acasalamento entre irmãos por mais de 20 gerações consecutivas e formas alélicas homozigóticas para todos os *loci* do genoma (Godard & Guenét, 1999), como por exemplo BALB/c e C57BL/6 . É importante ressaltar que por meio da manipulação genética das linhagens isogênicas são obtidas todas as colônias de animais transgênicos, *knockouts* e mutantes induzidos (Feijó et al, 2010), dentre eles, pode-se citar a linhagem  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  *knockout*. O conhecimento das características genéticas de cada uma destas linhagens é indispensável para a escolha do modelo mais adequado ao trabalho experimental com camundongos (Taft et al, 2006; Yoshiki & Moriwaki, 2006). É importante salientar que nas linhagens isogênicas, a heterozigose residual e a isogenia incompleta podem levar à formação de sub-linhagens. Além disso, as mutações espontâneas e o isolamento físico de uma linhagem, separando um ramo parental por mais de 20 gerações, também podem originar o aparecimento de sub-linhagens (Valdar et al, 2006; Champy et al, 2008).

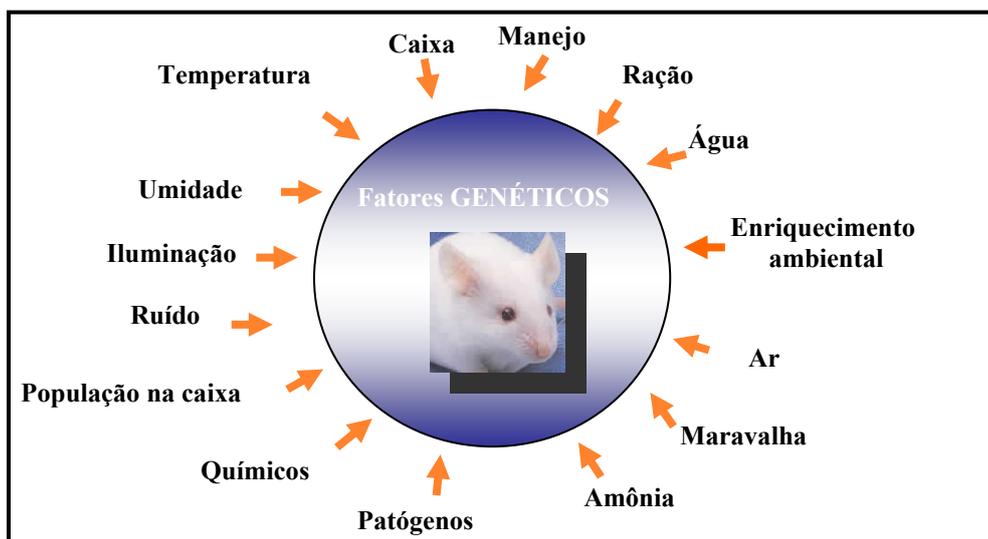
### **3.1.2 Classificação sanitária**

No que diz respeito ao padrão sanitário dos animais de laboratório, podemos classificá-los conforme a microbiota associada e a complexidade do sistema de barreiras de proteção nos quais são mantidos. Desta forma, estes animais são classificados em axênicos ou livres de germes, gnotobióticos ou de flora definida, livres de patógenos especificados ou *specific pathogens free* (SPF), livres de patógenos oportunistas especificados ou *specific opportunistic pathogens free* (SOPF) e convencionais ou indefinidos (Andrade et al, 2002; Lapchik et al, 2010). Neste contexto, os animais axênicos são isentos de microbiota associada, enquanto que nos gnotobióticos todas as formas de vida associadas são conhecidas e ambos devem ser mantidos em unidades isoladoras com pressão positiva (Trexler & Renolds, 1957).

Os animais SPF são livres de patógenos especificados e os SOPF são livres de agentes patogênicos e oportunistas especificados. A criação de linhagens com estes padrões sanitários deve ser realizada em ambientes protegidos por barreiras sanitárias rigorosas que compreendam elementos físicos, químicos, instalações, procedimentos padronizados e uso de equipamentos que impeçam a entrada de agentes indesejáveis. Já os animais com microbiota indefinida são denominados convencionais e são mantidos em ambientes desprovidos de barreiras rigorosas (Lapchik et al, 2010). Existe ainda o conceito *Virus Antibody Free* (VAF) em que os animais não possuem anticorpos sorologicamente demonstráveis contra vírus (Phimister et al, 2003).

### ***3.1.3 Padronização genética e sanitária***

Visando a reprodutibilidade e a qualidade dos resultados experimentais, os animais de laboratório devem possuir características genéticas e sanitárias padronizadas, avaliadas periodicamente, visando a certificação das colônias de criação. Necessário se faz a supervisão constante da aplicação correta das técnicas de manejo e o monitoramento periódico das condições de saúde e de ambiente recomendadas para cada espécie a fim de se propiciar bem-estar ao animal de forma a não interferir em seu equilíbrio fisiológico, biológico e comportamental (**Figura 1**). Além disso, o emprego de práticas e procedimentos com a finalidade de barreiras de proteção destinado a evitar a contaminação do macro e microambientes e dos animais, também devem ser considerados na produção de animais com padrões biológicos definidos (Ferreira et al, 2005; Majerowicz, 2005; National Research Council, 2008).



**Figura 1:** Fatores externos que interferem no equilíbrio fisiológico, biológico e comportamental de camundongos. **Fonte:** Modificada de Lapchik et al, 2010, pág 519.

### 3.1.4 Monitoramento sanitário

As infecções murinas são causadas por diversos tipos de agentes que podem ser não patogênicos ou patogênicos, induzindo sinais clínicos com morbidade e mortalidade variáveis (Hedrich, 2004). Assim, além de estabelecer procedimentos e rotinas adequadas em um biotério, é de fundamental importância a implantação do controle sanitário das colônias. Esta monitorização tem o objetivo de checar a presença de parasitos, bactérias, vírus e fungos, a fim de se alcançar um animal sanitariamente definido que assegure a reprodutibilidade dos resultados experimentais.

No monitoramento sanitário, a partir da detecção do agente em um animal ou grupo de animais, considera-se que os outros animais da colônia também sejam portadores potenciais do mesmo agente, desde que a amostragem realizada tenha sido adequada. Para uma correta amostragem, selecionam-se animais de gaiolas e localizações diferentes, contemplando-se toda a sala, bem como machos e fêmeas de diferentes idades. Em 1976, o *Institute Laboratory Animal Research* (ILAR) publicou a fórmula  $N = \log\alpha / \log(1-P)$ , utilizada como referência para estimar o número de animais necessários para a monitorização sanitária de colônias constituídas por 100 ou mais animais, levando-se em consideração o grau de confiabilidade na probabilidade de detecção de no mínimo um animal positivo na colônia. De acordo com a FELASA (2002), a periodicidade do monitoramento está relacionada às circunstâncias e necessidades de cada biotério. Em colônias de animais axênicos, a frequência deve ser de quinze a vinte dias, em gnotobióticos de vinte a trinta dias, em SPF de dois a três meses e em

colônias de animais convencionais de seis a doze meses.

Segundo recomendações da FELASA (2002), o monitoramento deve estar fundamentado no potencial patogênico dos microorganismos, nas suas interferências nos resultados experimentais, nas alterações fisiológicas provocadas no hospedeiro e, principalmente, no potencial zoonótico do agente. Contudo, embora a maioria das infecções seja assintomática, pode-se assegurar que potencialmente qualquer agente infeccioso é capaz de provocar alterações nas respostas fisiológicas do animal (Bugarski et al, 2005; Lapchik et al, 2010).

### ***3.2 Caracterização hematológica, bioquímica e imunológica***

O padrão fisiológico dos animais pode ser determinado por meio da avaliação sanguínea dos parâmetros hematológicos, bioquímicos e imunológicos (Borjesson et al, 2000). A aquisição de informações acerca da fisiologia de camundongos com fins de experimentação se faz necessária uma vez que testes hematológicos, bioquímicos e imunológicos são capazes de determinar a existência de alguma patologia, validar drogas, monitorar tratamentos e também de propiciar a manutenção da própria colônia com animais de qualidade (Majerowicz, 2005). Os parâmetros hematológicos são utilizados em diagnósticos como biomarcadores, uma vez que podem sugerir lesões em outros órgãos ou tecidos e ainda, por auxiliarem na criação animal, dado que as alterações neste perfil podem indicar infestações e infecções ou até mesmo mudanças ambientais (Shahsavani et al, 2010). A determinação dos parâmetros bioquímicos fornecem importantes informações com relação ao estado clínico do animal, balanço nutricional, situações deficitárias, monitorações de tratamentos e prognósticos (González et al, 2001). Já o conhecimento de características imunológicas é de grande importância na avaliação de desordens imunológicas hereditárias e adquiridas (Alamooti et al, 2010).

O conhecimento dos valores sanguíneos referentes a parâmetros hematológicos, bioquímicos e imunológicos possibilita a caracterização adequada do perfil de cada espécie e suas variações genéticas. A caracterização correta destes parâmetros em valores de referência deve considerar algumas características próprias da espécie como sexo, linhagem, idade, genótipo, condições de saúde, estresse, dentre outros (Almeida et al, 2008). Por meio da comparação destes parâmetros obtidos de um indivíduo ou de um grupo de indivíduos com o perfil estabelecido, é possível diagnosticar patologias no início do processo, mesmo antes do

aparecimento dos sinais clínicos das mesmas. Desta forma, as condições de saúde e bem-estar dos animais são atestadas e permitem a obtenção de resultados científicos mais consistentes e confiáveis. Neste contexto, a caracterização desses parâmetros permite uma correta validação dos experimentos, ao mesmo tempo em que auxilia na promoção do sucesso da criação destes animais em cativeiro (Troiano et al, 2008).

### ***3.3 Valores de referência***

A Organização Mundial de Saúde (OMS), a Federação Internacional de Química Clínica (IFCC) e o Instituto de Padronização Clínica e Laboratorial (CLSI) definem valor de referência como um valor (resultado) obtido pela observação ou mensuração quantitativa de um analito em um indivíduo selecionado, com base em critérios bem definidos (Ferreira & Andriolo, 2008). Estes valores são o resultado da quantidade de um certo tipo de analito obtido de um único indivíduo ou grupo de indivíduos correspondente à uma descrição declarada que precisa ser divulgada e viabilizada para uso de outros. Esta referência pode ser definida pelo intervalo entre dois valores de percentil, localizado em torno da mediana na escala de probabilidade. Os limites padrões utilizados em química clínica são os percentis 25 e 75% definidos em um intervalo de confiança de 95% (Wright & Royston, 1999).

Os valores de referência com base no indivíduo são valores prévios, de um mesmo indivíduo, obtidos quando este estava em um estado definido de saúde. Já os valores de referência com base na população são aqueles obtidos de um grupo de indivíduos - referência sistematicamente definido e são usualmente os tipos de valores referidos (Burtis et al, 2008).

Um dos fatores mais críticos em patologia veterinária é a avaliação de valores de referência para a interpretação dos resultados obtidos para um determinado indivíduo. Muitas vezes, os valores observados são comparados com valores de referência já estabelecidos e os resultados fornecidos são tidos como informações de prognóstico, diagnóstico ou relevância terapêutica. Portanto, valores inapropriados podem levar à uma decisão clínica atrasada ou até mesmo errônea, com efeitos negativos e até mesmo drásticos sobre a evolução de indivíduos (Lefebvre, 2011).

Desta forma, o estabelecimento de valores de referência em um laboratório pode ser feito por meio da criação de seus próprios valores, da validação dos dados de bulas reagentes ou ainda, da utilização de dados disponíveis na literatura (Ferreira & Andriolo, 2008). A determinação de valores de referência próprios é a escolha mais desejável para a grande maioria dos testes, pois reflete a real condição da população estudada, sendo, porém, a mais

trabalhosa e onerosa. Para essa determinação devem ser avaliadas as variáveis biológicas, definidas como todos os fatores que podem interferir individualmente em uma determinada condição, promovendo uma variação intra-indivíduo (Solberg & Cpetitclerc, 1988). Após a determinação destas variáveis, um conjunto de critérios de seleção mostrará quais indivíduos devem ser incluídos no grupo de indivíduos referência. Estes critérios de seleção incluem a fonte da população, especificações de critérios de saúde e as doenças de interesse (Burtis et al, 2008).

Os valores de referência devem ser utilizados como uma ferramenta, mas não como único meio para determinar se os resultados são “normais ou anormais”, ou ainda se as alterações são ou não resultados de algum procedimento experimental (Weiss & Wardrop, 2010).

### ***3.4 O sangue e seus componentes***

O sangue é um tecido conjuntivo fluido, produzido na medula óssea vermelha, cuja função é estabelecer contato entre as diversas partes do organismo animal servindo como meio de troca e transporte de substâncias essenciais à vida. Este tecido está contido em um compartimento fechado, o aparelho circulatório, que o mantém em movimento regular e unidirecional, devido essencialmente às contrações rítmicas do coração (Junqueira & Carneiro, 2004). Além disto, o sangue é uma das vias utilizadas pelo sistema imune para exercer seu papel de defesa do organismo frente a invasões diversas (Goulart, 2006).

#### ***3.4.1 Hematologia***

O termo hematologia é de origem grega e significa o estudo da fisiologia e patologia de elementos celulares do sangue (Rodak, 1995; Hedrich, 2004). A hematologia básica envolve a análise da concentração, estrutura e funções dos elementos que compõem o sangue e seus produtos. Dentre os três maiores componentes do sangue estão glóbulos vermelhos (eritrócitos, hemáceas), glóbulos brancos (leucócitos) e plaquetas (trombócitos) (Lewis et al, 2006).

### 3.4.1.1 *Série vermelha*

A massa de glóbulos vermelhos do sangue é mensurada por meio de três parâmetros: glóbulos vermelhos (RBC), hematócrito (HCT) e hemoglobina (HGB). Os eritrócitos de camundongos são geralmente produzidos na medula óssea e no baço, diferentemente de outras espécies (Hedrich, 2004). Sua principal função é o transporte de oxigênio aos tecidos e, toda a energia acumulada é direcionada à manutenção da forma das células, da estrutura das membranas, das funções enzimáticas, da redução do ferro na hemoglobina, dentre outras (Hoffbrand, 2001). Os eritrócitos maduros de camundongos e ratos são arredondados, anucleados, com discos centrais bicôncavos, diâmetro médio em adultos entre 5 e 7  $\mu\text{m}$ , espessura de 2.1 a 2.13  $\mu\text{m}$  e volume variando entre 40 e 50 fL (**Figura 2**). Quando comparados com outras espécies de não roedores possuem uma maior policromasia e anisocitose devido ao alto percentual de reticulócitos circulantes. A contagem de RBC varia de 7 a 11  $\times 10^6/\text{mm}^3$  em camundongos, sendo mais alta que em outras espécies devido ao seu pequeno tamanho (Weiss & Wardrop, 2010).

O hematócrito é mensurado por meio do percentual relativo das hemáceas no sangue total (Bain, 2006) e seus valores em camundongos estão, em geral, entre 40 e 50% (Weiss & Wardrop, 2010).

A hemoglobina é o principal componente dos eritrócitos e tem como função o transporte de oxigênio ( $\text{O}_2$ ) dos pulmões aos tecidos e o retorno do dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) para os pulmões. É responsável também pelo transporte de elétrons, redução do oxigênio e transferência do oxigênio para reações de hidroxilação (Turgeon, 2005). A concentração de hemoglobina é mensurada pelo volume total da mesma nos eritrócitos e todas as suas formas, funcionais ou não, são incluídas na determinação. Sua concentração em camundongos está entre 10 e 17 g/dL (Weiss & Wardrop, 2010).

A relação entre os parâmetros da série vermelha pode ser obtida pela análise dos índices hematimétricos que irão fornecer informações adicionais sobre as hemáceas e hemoglobina. O volume corpuscular médio (VCM) avalia a média do tamanho (volume) das hemáceas, que podem estar em seu tamanho normal (normocíticas), diminuídas (microcíticas) ou aumentadas (macrocíticas) (Bain, 2006). O VCM de camundongos é de aproximadamente 45 a 55  $\text{fm}^3$ . A hemoglobina corpuscular média (HCM) corresponde à média da quantidade de hemoglobina em cada eritrócito e em camundongos varia de 13 a 17 pg. Já a concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM) mensura a concentração de hemoglobina nos

eritrócitos e geralmente está em torno de 30 e 38 g/dL nesta mesma espécie (Weiss & Wardrop, 2010).

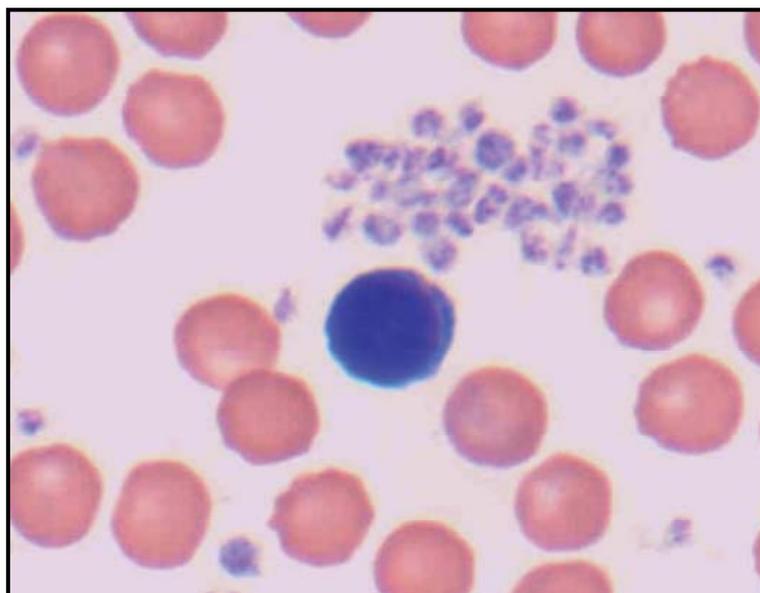


**Figura 2:** Esfregaço sanguíneo de rato saudável. Eritrócitos, plaquetas, neutrófilo segmentado e pequeno linfócito. Corado com Wright. **Fonte:** Weiss & Wardrop, 2010, pág 856.

#### **3.4.1.2 Série branca**

Os leucócitos participam dos processos imunes e inflamatórios e sua quantificação em roedores inclui a contagem total e diferencial. Geralmente sua contagem está entre 2 e 10 x 10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>. Os principais tipos de leucócitos avaliados durante a contagem diferencial são linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos (Hedrich, 2004; Weiss & Wardrop, 2010).

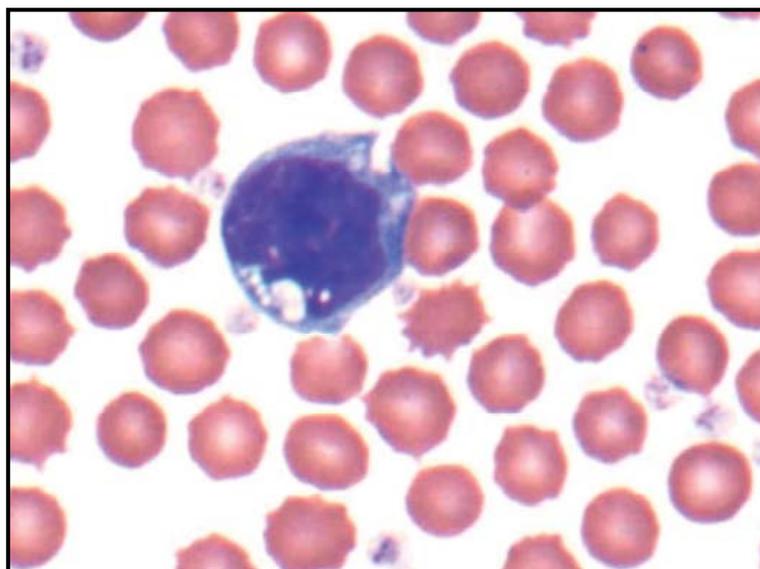
As células linfóides auxiliam na resposta imune inata do organismo, mas a maioria delas é responsável por mediar a imunidade adaptativa (Turgeon, 2005). Em camundongos, os linfócitos podem ser pequenos (típicos) ou grandes (atípicos), sendo que os primeiros possuem pouco citoplasma e núcleo excêntrico com cromatina condensada, enquanto que os segundos possuem citoplasma mais extenso (**Figura 3**). Os linfócitos compreendem de 70 a 80% da contagem diferencial de leucócitos em camundongos, podendo apresentar contagens acima de 80% em animais jovens (Hedrich, 2004; Weiss & Wardrop, 2010).



**Figura 3:** Esfregaço sanguíneo de camundongo saudável. Linfócitos e plaquetas agregados. Corado com Wright. **Fonte:** Weiss & Wardrop, 2010, pág 858.

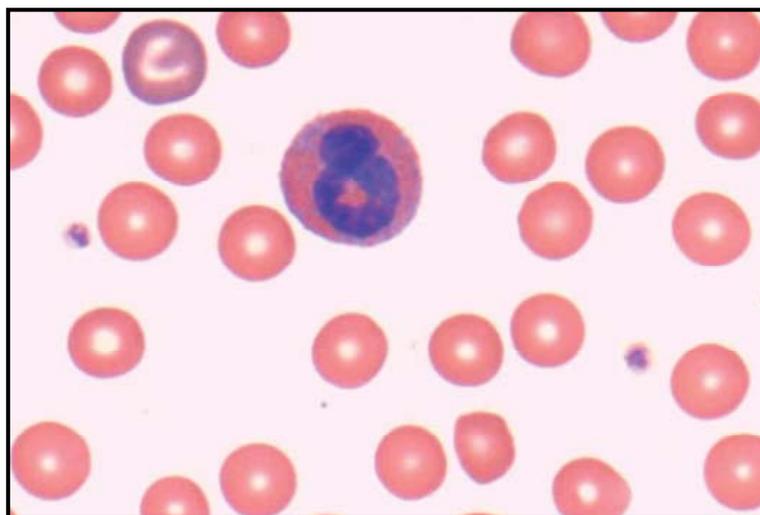
Os neutrófilos apresentam a primeira linha de defesa contra a invasão de microorganismos, trauma nos tecidos ou algum sinal inflamatório como fagócitos circulantes e moduladores da resposta imune. Eles têm como mecanismo básico de ação a fagocitose e posterior destruição dos agentes estranhos via mecanismos enzimáticos ou dependentes de oxigênio (Souza et al, 2006). Juntamente com os macrófagos atuam de forma eficaz na ligação entre a resposta imune inata e adaptativa (Scott & Krauss, 2011). Em camundongos e ratos, estas células possuem citoplasma pálido com grânulos corados de rosa mais fraco e núcleo tipicamente segmentado (**Figura 2**). Sua contagem em camundongos está entre 20 e 30% da contagem total de leucócitos (Hedrich, 2004; Weiss & Wardrop, 2010).

Os monócitos juntamente com os macrófagos livres e fixados nos tecidos e suas células progenitoras na medula óssea compõem os fagócitos mononucleares. Estas células são responsáveis pela fagocitose e destruição de bactérias. A aderência dos monócitos à superfície bacteriana é a primeira etapa da ativação dessas células e início da resposta imunológica (Brandt et al, 2003). Monócitos de camundongos são similares aos de outras espécies e possuem núcleo pleomórfico, podendo ser arredondado, recortado ou lobular e citoplasma extenso, frequentemente contendo vacúolos (**Figura 4**). Nesta espécie compreendem de 0 a 2% da contagem total de leucócitos (Hedrich, 2004; Weiss & Wardrop, 2010).



**Figura 4:** Esfregaço sanguíneo de camundongo saudável. Monócito. Corado com Wright.  
**Fonte:** Weiss & Wardrop, 2010, pág 858.

Os eosinófilos são células mediadoras da patogênese de muitos processos inflamatórios juntamente com os basófilos, incluindo as infecções por helmintos e doenças alérgicas. Em resposta a estes diversos estímulos, os eosinófilos são recrutados da circulação para o foco da inflamação, onde modulam as respostas imunes por meio de uma série de mecanismos, sendo importantes na imunidade inata e também adaptativa (Rothenberg, 2006). Camundongos e ratos têm citoplasma arredondado e ocasionalmente um núcleo em formato de anel que é parcialmente escondido pela presença de grânulos com tonalidade variando do laranja avermelhado a vermelho. Os grânulos são grandes, arredondados e uniformes no tamanho (**Figura 5**). Seu percentual em camundongos representa de 0 a 7% da contagem total de leucócitos (Hedrich, 2004; Weiss & Wardrop, 2010).



**Figura 5:** Esfregaço sanguíneo de rato saudável. Eosinófilo. Corado com Wright. **Fonte:** Weiss & Wardrop, 2010, pág 857.

Os basófilos são células idênticas aos mastócitos com relação à composição e função, no entanto, funcionam de forma independente e são imunofenotipicamente distintas umas das outras, bem como de outras células hematopoiéticas. São granulócitos polimorfonucleados que produzem citocinas em defesa contra parasitos e também são responsáveis pela inflamação alérgica mediada pela imunoglobulina (Ig) E (Abbas et al, 2008). Apesar de serem bastante distintos, raramente são observados em esfregaços de sangue periférico. Os basófilos de camundongos e ratos possuem núcleo lobulado e citoplasma contendo grânulos roxos grandes e arredondados que podem ser numerosos ou não, chegando a obscurecer o núcleo da célula (**Figura 6**). Sua contagem em camundongos está entre 0 e 1% da contagem total de leucócitos (Hedrich, 2004; Weiss & Wardrop, 2010).



**Figura 6:** Esfregaço sanguíneo de rato saudável. Basófilo. Corado com Wright. **Fonte:** Weiss & Wardrop, 2010, pág 857.

#### **3.4.1.3 Série Plaquetária**

As plaquetas (PLT) são células fragmentadas, anucleadas, derivadas do citoplasma de megacariócitos (**Figuras 2 e 3**). Além da função hemostática, também possuem importante papel na manutenção da integridade do endotélio, por meio da liberação de citocinas pró-angiogênicas e fatores de crescimento (Kaplan & Jackson, 2011). As plaquetas de camundongos podem ser ativadas espontaneamente ou em resposta a um estímulo e o estágio de ativação pode ser linhagem dependente. Nesta espécie possuem diâmetro de 1 a 4  $\mu\text{m}$  e tempo de vida de aproximadamente 4 a 5 dias. No esfregaço sanguíneo, elas possuem formatos arredondados, oval ou alongados. O citoplasma apresenta tonalidade entre rosa claro e cinza e possui grânulos angulares azuis usualmente observados próximo ao centro da célula. Grânulos vermelhos também podem estar presentes. Sua contagem está entre 900 e 1600  $\times 10^3/\text{mm}^3$  (Weiss & Wardrop, 2010).

#### **3.4.2 Bioquímica**

O exame bioquímico tem a finalidade de avaliar as funções metabólicas desempenhadas pelos órgãos e tecidos, bem como evidenciar patologias ocultas (Feldman et al, 2000). Os perfis bioquímicos do sangue vêm sendo utilizados extensivamente em medicina veterinária não somente para a avaliação clínica individual, mas também para avaliar populações de animais (González et al, 2001). Coles (1986) e Silveira (1988), enfatizaram

sobre a importância do emprego destes exames, quando aliados à história clínica e ao exame físico, como um valioso auxílio diagnóstico à elaboração de um prognóstico e também no acompanhamento terapêutico de animais de pequeno e grande porte.

Os exames bioquímicos disponíveis na prática clínica avaliam as funções renal, hepática, pancreática e cardíaca, bem como evidenciam alterações no equilíbrio hídrico, eletrolítico e de minerais e também determinam alterações no metabolismo endócrino e da atividade muscular (Bergonso, 2007).

A avaliação renal é determinada pela mensuração de uréia e creatinina. A uréia é um produto do catabolismo de aminoácidos e proteínas. Gerada no fígado, é a principal fonte de excreção do nitrogênio do organismo, principalmente pela urina, sendo, portanto, também utilizada para avaliar funções renais (Burtis et al, 2008). Em camundongos com sete semanas de idade, a média deste metabólito encontrada no soro é de 20,7 mg/dL (Rusyn & Threadgill, *The Jacksons Laboratory*, 2010). A creatinina é derivada do catabolismo da creatina, existente em grande quantidade nos músculos esquelético e cardíaco, fígado e rins, resultando na produção de fosfato inorgânico e creatinina, e esta é normalmente excretada pelos rins, principalmente por filtração glomerular (Guyton & Hall, 2006). Sua dosagem em plasma de camundongos com oito semanas de idade tem média de 0,28 mg/dL (Riken BioResource Center, *The Jacksons Laboratory*, 2008). O aumento da taxa de creatinina no sangue ocorre em todas as patologias renais em que há diminuição da filtração glomerular. A dosagem de creatinina deve ser realizada em paralelo com a de uréia para uma melhor avaliação da reversibilidade da lesão. A creatinina sérica não é marcadamente influenciada pela dieta ou por hemorragias intestinais, mas uma severa perda muscular poderá reduzir sua quantidade (Bergonso, 2007).

A avaliação hepática mede as respostas às alterações anatômicas ou bioquímicas do fígado (Yen et al, 2005). Dentre os testes utilizados para esta avaliação pode-se incluir as dosagens de alanina aminotransferase (ALT/TGP), aspartato aminotransferase (AST/TGO), fosfatase alcalina (FA) e proteínas totais (PT). A ALT/TGP é encontrada abundantemente no fígado, em quantidades moderadas no rim e em pequenas quantidades no coração e na musculatura esquelética. Sua origem é predominantemente plasmática, fazendo com que se eleve rapidamente após a lesão hepática (Schumann et al, 2002). A AST/TGO é encontrada em diversos órgãos e tecidos, incluindo coração, fígado, músculo esquelético e eritrócitos. Está presente no citoplasma e mitocôndrias, portanto sua elevação indica um comprometimento celular mais profundo (Schumann et al, 2002). Em pequenos animais, o

aumento desta enzima é verificado em situações de desordens inflamatórias e degenerativas da musculatura esquelética, bem como em cardiomiopatias, por exemplo, isquemia, congestão, necrose, neoplasia, trauma (Coles, 1986). Segundo Rusyn & Threadgill, *The Jacksons Laboratory*, (2010), a dosagem média dos parâmetros acima citados em soro de camundongos com sete semanas de idade é de 41 U/L e 152 U/L, respectivamente. A fosfatase alcalina é composta por um grupo de isoenzimas associadas à membrana, localizada em vários tecidos, mas somente dois são importantes para o diagnóstico, o tecido ósseo e hepatobiliar. Está presente no fígado (células epiteliais do ducto biliar), ossos (osteoblastos), intestinos, rins e placenta. Com exceção dos animais em crescimento ou pacientes com doença óssea, a atividade sérica elevada de fosfatase alcalina tem origem hepatobiliar, principalmente devido à colestase e necrose por obstrução biliar intra - hepática (Feldman et al, 2000). As proteínas totais são encontradas em todos os componentes de todas as células, uma vez que são fundamentais na estrutura e funções celulares (Ravel, 1995). Elas sofrem alterações de importância clínica, principalmente nos processos inflamatórios (bacterianos e imunológicos), parasitários e metabólicos (Silveira, 1988). Em camundongos com seis meses de idade, a média de FA encontrada no soro é de 86 U/L e de PT no plasma é de 5,22 g/dL (Yuan & Korstanje, *The Jacksons Laboratory*, 2008).

### **3.4.3 Imunologia**

As subpopulações de leucócitos e suas respectivas quantificações são fortemente reguladas e permanecem relativamente constantes na circulação de diversas espécies de mamíferos. Desta forma, caso haja algum distúrbio na homeostase do indivíduo, processos de imunodeficiência e doenças autoimunes podem ser desencadeados (Petkova et al, 2008). Com relação ao fenótipo imunológico, os linfócitos podem ser classificados em dois tipos principais, com diversos subtipos, de acordo com o local onde se diferenciam e com os diferentes receptores presentes em suas membranas. Nos linfócitos B, esses receptores são imunoglobulinas e nos linfócitos T são moléculas protéicas chamadas TCR (*T Cell Receptors*). Além destes, existem também as células *Natural Killer* (NK) que não apresentam em sua superfície os marcadores que caracterizam os linfócitos T e B. São responsáveis pela resposta a células cancerosas e infectadas por vírus, sem a necessidade de estímulo prévio (Roitt, 2003; Abbas et al, 2008).

A contagem de linfócitos T e de suas subpopulações e linfócitos B é amplamente

utilizada no diagnóstico e no monitoramento terapêutico de várias doenças. Além disso, esta determinação é de grande importância na avaliação de desordens imunológicas hereditárias e adquiridas (Alamooti et al, 2010). Neste contexto, a técnica de imunofenotipagem tem sido utilizada na contagem das subpopulações de linfócitos e também na avaliação das funções destes linfócitos, como por exemplo, na ativação e na proliferação de respostas a antígenos (Alamooti et al, 2010; Curtis et al, 2011). Estas análises podem ser realizadas por meio de citômetros de fluxo, utilizados para avaliar a emissão de fluorescência das células, e que são também denominados de FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorter*). Alguns aparelhos são capazes de separar fisicamente as células, de acordo com as características citométricas. As células da amostra em suspensão são marcadas com anticorpos monoclonais específicos ligados a fluorocromos, que permitem a identificação e a quantificação de células pelo tamanho, granulosidade e intensidade de fluorescência (Roitt, 2003; Nakage et al, 2005).

De acordo com Petkova & Roopenian, (2007), a média do percentual de subpopulações de linfócitos totais encontrada no soro de sangue periférico de fêmeas e machos com 6 meses de idade de 32 linhagens avaliadas foi de 19 % para células CD4<sup>+</sup>, 17% para células CD8<sup>+</sup>, 50% para células CD19<sup>+</sup> e 5% para células NK.

### **3.5 Considerações pré - analíticas e analíticas**

Os testes laboratoriais avaliam as condições fisiológicas e o estado de saúde de um determinado indivíduo. Quando os resultados encontrados estão acima ou abaixo dos valores de referência, eles são considerados anormais, levantando ou confirmando a possibilidade de uma condição patológica. Porém, muitas vezes existem condições em que os resultados dos testes laboratoriais não se enquadram nos limites definidos como normais, embora o indivíduo não apresente uma condição patológica (Vieira, 2002). Em análises clínicas, o processamento de uma amostra biológica obtida adequadamente para fins laboratoriais é composto por três fases: pré - analítica, analítica e pós - analítica. Em cada etapa existem vários fatores de interferência que podem provocar falsos resultados experimentais de forma a comprometer a qualidade e a confiabilidade dos mesmos (Picarelli, 2004).

Neste contexto, em roedores de laboratório muitos fatores pré - analíticos podem afetar os parâmetros pesquisados, alterando assim, a avaliação dos valores de referência (Weiss & Wardrop, 2010). Tais fatores incluem as particularidades do animal, o processo de coleta da amostra, bem como a sua manipulação. Na análise dos resultados deve-se considerar

estes fatores tanto no momento do diagnóstico quanto no acompanhamento da resposta ao tratamento de uma patologia. Dentre estes fatores, pode-se citar as variações fisiológicas relativas à dieta, ritmos biológicos, estresse, patologias, além dos problemas relacionados à coleta das amostras, como o tipo de material utilizado, as condições de manuseio, acondicionamento e as consequências na preservação física dos analitos (Vieira, 2002).

Embora os procedimentos pré - analíticos sejam de fundamental importância nos resultados dos testes, os analíticos, incluindo o método (equipamentos, reagentes, calibradores, tipo de dados brutos e método do cálculo), o controle de qualidade e o critério de confiança também devem ser avaliados. O mesmo método analítico deve ser utilizado para assegurar a comparação entre os valores de referência e os valores observados (Burtis et al, 2008). Características da metodologia, como precisão, exatidão, sensibilidade analítica, linearidade, reprodutibilidade e potenciais interferentes devem ser conhecidas e, na medida do possível, estar sob controle estrito (Ferreira & Andriolo, 2008). A **Tabela 1** apresenta os principais fatores pré - analíticos e analíticos que interferem nos resultados experimentais.

**Tabela 1:** Principais fatores que afetam resultados experimentais

Fatores pré - analíticos	Fatores analíticos
Sexo Dieta Biotério de origem Jejum Via da coleta Habilidade do técnico Anticoagulante, matriz da amostra Instrumento de laboratório e metodologia Estocagem da amostra Manipulação dos animais antes da coleta Ordem da coleta, processamento e análise	Limpeza da vidraria Procedimento de pipetagem Preparo dos reagentes Modificações visuais no reagente Prazo de validade dos reagentes Ordem de leitura das amostras Tempo e temperatura de incubação Manutenção preventiva dos equipamentos Verificação dos controles Protocolo correto Fator de calibração

Fonte: Weiss & Wardrop, 2010, pág 853; Labtest, 2010.

Na fase pós - analítica é necessário verificar a conformidade dos cálculos, se o resultado encontrado está dentro da linearidade do método e as diluições das amostras. Além disso, os relatórios dos resultados devem conter laudos legíveis, impedindo erros em sua

interpretação e a transcrição correta deve ser observada (Harris & Yasaka, 1983).

Portanto, é fundamental que nos grupos controle e experimental todas as condições supracitadas sejam similares de modo a minimizar as alterações demonstradas nas análises.

### 3.6 Coleta de sangue

A coleta de sangue em camundongos é um procedimento necessário para uma ampla variedade de estudos científicos e atualmente, existe uma série de metodologias eficazes disponíveis (Hoof, 2000; Steel et al, 2008; Aasland et al, 2010). Nestes animais, o volume de sangue circulante está entre 6,3 e 8 mL/100 g de peso corporal, com média de 7,2 mL/100 g de peso corporal (Weiss & Wardrop, 2010). É importante enfatizar que a sangria pode causar estresse nos animais de forma a impactar nos resultados experimentais (Hoof, 2000). O *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (2003) preconiza que é extremamente importante que este procedimento seja realizado por pessoal qualificado com habilidade na técnica de coleta a ser empregada e que saiba minimizar o estresse do animal.

Vários critérios são avaliados para selecionar o método da coleta, como a análise a ser realizada, o volume total por amostra, a frequência de amostragem e se o procedimento é terminal ou de recuperação do animal. Em camundongos, esses critérios têm maiores consequências devido a certas limitações que incluem o seu pequeno porte, o volume de sangue e a falta de vasos de fácil acesso (Schnell et al, 2002). Na **Tabela 2**, encontram-se as principais técnicas de sangria empregadas nestes roedores. O local da sangria e o método aplicado devem ser mantidos durante todo o experimento a fim de se evitar variações nos resultados experimentais (Steel et al, 2008).

**Tabela 2:** Principais procedimentos de coleta de sangue em camundongos

Com uso de anestésico	Sem uso de anestésico	Terminal
Veia da cauda	Veia safena	Punção cardíaca
Plexo orbital	Veia dorsal da pata	Veia cava posterior
Veia jugular	Veia submandibular	Vasos axilares

Fonte: Modificado de Lapchik et al. 2010, págs 581 a 590.

A fim de minimizar a dor e o estresse do animal, é recomendado que em todas as técnicas sejam utilizados anestésicos, ou ainda, que os animais sejam sacrificados previamente aos experimentos até que o manipulador se sinta confortável e não cause danos ao animal (Hoof, 2000).

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **4.1 Monitoramento sanitário**

A fim de se verificar a qualidade sanitária dos animais produzidos no Biotério de Produção do CPqRR foi realizado o monitoramento sanitário das colônias em cumprimento à rotina previamente estabelecida no Procedimento Operacional Padrão (POP) BIOT – 18 da instituição preconizada pelas normas de Boas Práticas de Laboratório (BPLs). Desta forma, seguindo recomendações da FELASA, uma amostragem de 10 animais por sala de criação do biotério, totalizando 50 animais, foi enviada ao Serviço de Controle de Qualidade Animal (SCQA) do CECAL / FIOCRUZ para a avaliação do estado de saúde dos mesmos.

Para a realização do monitoramento sanitário das colônias de roedores foram utilizados diferentes métodos de diagnóstico para detecção de agentes patogênicos primários e oportunistas como vírus, bactérias e parasitos (**Tabela 3**). O teste de ELISA (teste imunoenzimático) foi utilizado como método de sorodiagnóstico na pesquisa de anticorpos séricos contra vírus e algumas bactérias. O monitoramento microbiológico incluiu também técnicas de isolamento e identificação de bactérias entéricas e respiratórias por meio do uso de meios de cultura seletivos e diferenciais. Os métodos de parasitologia empregados foram úteis na pesquisa e identificação de ecto e endoparasitos. Assim, por meio da avaliação sanitária foi possível atestar a presença ou não de agentes patogênicos e oportunistas que acometem camundongos e interferem nos parâmetros hematológicos, bioquímicos e imunológicos. É importante mencionar que o monitoramento sanitário também foi realizado nos animais do CECAL e que toda a metodologia empregada na avaliação dos animais convencionais do CPqRR foi a mesma adotada para os animais SPF do CECAL, que por sua vez é a mesma metodologia utilizada na rotina do SCQA. Os resultados do monitoramento sanitário dos biotérios do CPqRR e CECAL encontram-se nos **Anexos 8.1 e 8.2** respectivamente.

Neste contexto, os animais do CPqRR são enviados semestralmente para realização da avaliação sanitária e após a liberação dos resultados, as colônias são tratadas com anti-helmíntico de acordo com o protocolo estabelecido por Sueta et al, 2002. Já no CECAL, as colônias de animais SPF são monitoradas a cada três meses e, caso seja identificado algum vírus e / ou bactérias, os animais infectados são sacrificados e as salas de origem dos mesmos isoladas e esterilizadas por meio de fumigação com éter. Contudo, se o descarte dos animais infectados não for possível, é realizada a técnica de histerectomia em fêmeas grávidas da linhagem a fim de se eliminar os patógenos que não são transmitidos pela via placentária como uma forma de recuperação do padrão SPF nos filhotes.

**Tabela 3:** Principais agentes pesquisados, amostras e métodos utilizados no monitoramento sanitário realizado pelo SCQA

<b>Agente pesquisado</b>	<b>Amostra</b>	<b>Método de diagnóstico</b>
<b>Vírus</b>		
Adenovírus (MAV)	Soro	ELISA
Citomegalovírus (MCMV)	Soro	ELISA
Ectromelia vírus	Soro	ELISA
Parvovírus	Soro	ELISA
Pneumovírus de camundongos (PVM)	Soro	ELISA
Poliomavírus	Soro	ELISA
Reovirus tipo 3 (REO 3)	Soro	ELISA
Rotavírus (EDIM)	Soro	ELISA
Sendai vírus	Soro	ELISA
Vírus da Coriomeningite linfocítica murina(LCMV)	Soro	ELISA
Vírus da Encefalomielite murina (Theiler)	Soro	ELISA
Vírus da Hepatite Murina (MHV)	Soro	ELISA
Vírus Diminuto de Camundongos (MMV)	Soro	ELISA
<b>Bactérias</b>		
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Traquéia/Fezes	Cultura
Bacillus associados aos cílios respiratórios	Traquéia/Fezes	Cultura
<i>Citrobacter rodentium</i>	Traquéia/Fezes	Cultura
<i>Corynebacterium bovis</i>	Traquéia/Fezes	Cultura
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Traquéia/Fezes	Cultura
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	Soro	ELISA
<i>Pasteurella</i> spp.	Traquéia/Fezes	Cultura
<i>Pseudomonas</i> spp.	Traquéia/Fezes	Cultura
<i>Salmonella</i> spp.	Traquéia/Fezes	Cultura
<i>Staphylococcus aureus</i>	Traquéia/Fezes	Cultura
<i>Streptococcus beta hemolitico (grupo D)</i>	Traquéia/Fezes	Cultura
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Traquéia/Fezes	Cultura
<i>Clostridium piliformis</i> – Tyzzer	Soro	ELISA
<b>Parasitas</b>		
Ectoparasitas: pulgas, ácaros e piolhos	pêlo	Estereoscópio
<i>Syphacia</i> spp.	intestino	Microscópio
<i>Aspicularis tetráptera</i>	intestino	Microscópio
<i>Rodentolepis nana</i>	intestino	Microscópio
Tricomonídeos	intestino	Microscópio
<i>Spiroucleus muris</i>	intestino	Microscópio
<i>Giardia muris</i>	intestino	Microscópio
<i>Entamoeba</i> spp.	intestino	Microscópio

**Fonte:** <http://www.cecal.fiocruz.br>

## **4.2 Animais**

### **4.2.1 Seleção das linhagens**

O biotério do CPqRR atualmente possui 24 linhagens de camundongos das quais quatro (Swiss webster, BALB/c, C57BL/6 e B6.129.If $\gamma^{(-/-)}$  *knockout*) foram selecionadas para este estudo. Os animais são originários da Fundação Rockefeller, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Universidade Federal Fluminense (UFF) e *The Jacksons Laboratory*, respectivamente. A escolha por estas linhagens se justificou pelo fato de serem as mais utilizadas pelos usuários da instituição e, além disso, por haver disponibilidade de fornecimento das mesmas de origem SPF a partir de fonte externa.

### **4.2.2 Tamanho da amostra**

O cálculo do tamanho da amostra para estabelecimento dos valores de referência foi realizado por amostragem aleatória simples sem reposição de acordo com Migonte et al, (2000), admitindo-se como erro máximo o valor de 5% e levando-se em consideração o tamanho da colônia de cada linhagem. Desta forma, foram utilizados 22 machos e 22 fêmeas da linhagem Swiss webster, 21 machos e 21 fêmeas das linhagens BALB/c e C57BL/6 e 19 machos e 19 fêmeas da linhagem If $\gamma^{(-/-)}$  para cada grupo correspondente (convencional e SPF) para determinação dos perfis hematológico e bioquímico. Na avaliação imunofenotípica foram utilizados cinco animais de cada sexo de cada linhagem selecionada, pois o objetivo era somente a avaliação destes valores. Todos os animais deste estudo possuíam entre seis e oito semanas de idade, por ser esta a faixa etária em que são mais requisitados ao biotério.

Os animais avaliados neste estudo foram divididos em dois grupos distintos. O primeiro grupo (machos e fêmeas) foi composto pelas quatro linhagens de camundongos convencionais (Swiss webster, BALB/c, C57BL/6 e If $\gamma^{(-/-)}$ ) provenientes do biotério do CPqRR (n=166). Já o segundo grupo (machos e fêmeas), utilizado como controle, foi formado por quatro linhagens SPF (Swiss webster, BALB/c, C57BL/6 e If $\gamma^{(-/-)}$ ) provenientes do CECAL (n=166). É importante mencionar que em ambos os grupos foram utilizados os mesmos animais para realização das avaliações hematológicas, bioquímicas e imunológicas. Portanto, o número total de animais utilizados neste trabalho foi de 332 camundongos.

#### **4.2.3 Animais CPqRR**

Os animais provenientes do Biotério de Produção do CPqRR são mantidos em um padrão sanitário convencional controlado dotado de barreiras de proteção contra a entrada de patógenos e macroambiente com temperatura variando entre 20 e 24°C e luminosidade controlada por timer com fotoperíodo de 12 horas claro / 12 horas escuro. As matrizes são mantidas em mini-isoladores, enquanto que os animais destinados ao fornecimento são mantidos em caixas de polipropileno. Todos os animais possuem livre acesso à água e ração (Nuvilab CR1 Autoclavável, Nuvital). Os camundongos das linhagens Swiss webster, BALB/c e C57BL/6 são obtidos por meio de colônias de produção do biotério do CPqRR em que as matrizes são provenientes do CECAL e mantidas no sistema de acasalamento poligâmico um macho x duas fêmeas. Já a linhagem  $\text{Ifn-}\gamma^{(-)}$  é proveniente da colônia de fundação do próprio biotério do CPqRR. Estas colônias têm como finalidade sua própria manutenção e todos os acasalamentos são monogâmicos permanentes, com registro individual dos animais.

#### **4.2.4 Animais CECAL**

Os animais provenientes do CECAL são mantidos em condições sanitárias livres de patógenos especificados (SPF), protegidos por barreiras sanitárias rigorosas que impedem a entrada de agentes indesejáveis presentes no meio ambiente. A manutenção das condições ambientais é feita por meio do controle da temperatura ( $20^{\circ} \text{C} \pm 2$ ), umidade relativa do ar ( $50\% \pm 5$ ), ventilação (10-15 trocas de ar / hora) e fotoperíodo (12 horas claro / 12 horas escuro). Os animais são mantidos em mini-isoladores ou em caixas de polipropileno e possuem livre acesso à água e ração (Nuvilab CR1 Autoclavável, Nuvital). Este biotério possui colônia de fundação de todas as linhagens criadas, tornando-o auto-suficiente na obtenção de suas matrizes. É importante mencionar que a linhagem  $\text{Ifn-}\gamma^{(-)}$  deste biotério é proveniente do biotério do CPqRR, porém já estão separadas há mais de 20 gerações, sendo então consideradas sub-linhagens distintas.

A **Tabela 4** mostra as principais diferenças existentes entre os procedimentos e as barreiras sanitárias adotados nos biotérios do CPqRR e CECAL.

**Tabela 4:** Principais diferenças existentes entre os procedimentos / barreiras sanitárias adotados nos biotérios do CPqRR e CECAL

<b>Procedimentos / Barreiras sanitárias</b>	<b>Convencionais controlados CPqRR</b>	<b>SPF CECAL</b>
Porto de passagem com descontaminação por formol ou ácido peracético	–	x
Piso técnico	–	x
Air Lock	–	x
Controle de pressão	–	x
Controle da ventilação e troca de ar	–	x
Técnicos separados por salas	–	x
Autoclave de fronteira	x	x
Controle no fornecimento de animais	–	x
Acesso controlado	x	x
Quarentena	–	x
Separação física das áreas limpas e sujas	x	x
Adoção de banho para acesso à área limpa	x	x
Esterilização de uniformes	–	x
Esterilização de insumos	x	x
Esterilização de gaiolas e bebedouros	x	x
Racks e estantes ventilados	x	x
Frequência do monitoramento sanitário	semestral	trimestral

**Fonte:** Pesquisa direta.

Após a chegada dos animais provenientes do CECAL ao CPqRR, os mesmos foram mantidos no biotério por um período de sete dias para ambientação, a fim de se evitar a interferência do estresse nos resultados experimentais em decorrência do transporte. A determinação por este período também levou em consideração a não - ocorrência de infecções nos animais, uma vez que o biotério do CPqRR possui padrão sanitário convencional controlado.

#### ***4.3 Coleta de sangue***

O procedimento de coleta de sangue foi sempre realizado no período da manhã, a fim de se evitar variações nos parâmetros. Inicialmente, o animal foi anestesiado com a combinação dos fármacos Cloridrato de Quetamina 5% e Cloridrato de Xilazina 2%, em partes iguais, no volume final de 0,1mL, via intraperitoneal, quadrante lateral inferior direito, utilizando-se agulha 25 x 5 mm. Após a anestesia geral, cuja profundidade foi avaliada pela ausência do reflexo podal, foi realizada a punção cardíaca de acordo com Hoff, (2000). A identificação do local da punção é de 10 a 30° acima do abdômem, lateralmente à cartilagem xifóide. O volume total de sangue coletado nas linhagens consanguíneas foi de aproximadamente 500µL, enquanto que nas não-consanguíneas foi de aproximadamente 800µL. Quando o procedimento de sangria total não levou o animal ao óbito, o mesmo foi submetido à eutanásia por overdose dos fármacos acima mencionados, sendo a dosagem de três a quatro vezes maior que a dose anestésica, ou seja, 0,3 a 0,4 mL. A verificação do óbito dos animais foi realizada pela ausência de sinais vitais como batimentos cardíacos e movimentos respiratórios. Este procedimento foi realizado sob supervisão da médica veterinária Dra. Ana Carolina Peixoto Teixeira, CRMV-MG 5560. As amostras coletadas foram utilizadas para os procedimentos de avaliação dos parâmetros hematológicos, bioquímicos e imunológicos.

#### ***4.4 Determinação de parâmetros hematológicos***

Os perfis hematológicos foram determinados por meio da realização de hemogramas no Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração (LBDM) do CPqRR. As determinações foram realizadas em contador hematológico de células semi-automático, ABX Micros ABC Vet, apropriado para mensuração de parâmetros hematológicos veterinários. O

equipamento utiliza métodos baseados na variação da impedância gerada pela passagem das células diluídas em um diluente eletrolítico através de micro-orifícios calibrados (parâmetros de contagem das células e determinação do hematócrito) e na determinação espectrofotométrica após a lise das células vermelhas com diluente contendo ferricianeto e cianeto de potássio (parâmetros de dosagem de hemoglobina).

Desta forma, do volume total de sangue coletado de cada animal, aproximadamente 50 $\mu$ L foram retirados e acondicionados em eppendorfs de 1,5mL, previamente identificados, contendo 5 $\mu$ L de EDTA (Etilenodiaminotetracético) como anticoagulante. Os parâmetros avaliados foram: global de leucócitos, contagem de eritrócitos, hematócrito, concentração de hemoglobina, índices hematimétricos e número de plaquetas. Para verificar a calibração do equipamento foi utilizado o sangue controle ABX Minotrol 16 alto (H), normal (N) e baixo (L) previamente ao início de cada experimento. O sangue controle, por se tratar de uma preparação estável, fornece um meio útil de monitoramento da precisão e exatidão da instrumentação de hematologia e dos sistemas de reagentes.

#### ***4.4.1 Contagem diferencial de leucócitos por microscopia ótica***

Após a coleta de sangue total foi realizado o esfregaço sanguíneo para contagem diferencial de leucócitos. A fim de se evitar possíveis variações sanguíneas como a formação de coágulos e alterações morfológicas das células e desta forma obter esfregaços de boa qualidade, este procedimento foi realizado imediatamente após a punção cardíaca dos animais. Posteriormente, as lâminas foram identificadas e coradas com o kit Panótico Rápido LB (Laborclin Ltda, BR) segundo instruções do fabricante ([www.laborclin.com.br](http://www.laborclin.com.br)). A metodologia aplicada na realização da contagem diferencial destas células permitiu determinar o percentual e o número absoluto de linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos e a leitura das lâminas foi realizada com o auxílio de microscópio ótico no aumento de 1000x, contando - se no mínimo 100 leucócitos por lâmina.

#### ***4.5 Determinação dos parâmetros bioquímicos***

Para determinação do perfil bioquímico foram coletados 200 $\mu$ L de sangue de cada animal em eppendorfs de 1,5mL, previamente identificados e centrifugados a 4.750 g por 10 minutos a temperatura ambiente para obtenção do soro. Posteriormente, o soro foi

rapidamente coletado e congelado a  $-70^{\circ}\text{C}$  e as amostras que apresentaram hemólise excessiva foram descartadas.

Todas as análises bioquímicas foram validadas e realizadas no LBDM por meio de espectrofotometria, utilizando - se o analisador bioquímico semi-automático Bioplus-200 adquirido da Bioplus Produtos para Laboratórios Ltda. A avaliação da função renal foi determinada por meio da dosagem de URE e CRE. Já para a função hepática, os seguintes parâmetros foram mensurados: AST/TGO, ALT/TGP, FA e PT. A programação de todas as químicas foi inserida no equipamento utilizado conforme pré-estabelecido pelo fabricante dos kits (Labtest Diagnóstica Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil). O volume mínimo de amostra para realização dos testes é de  $10\mu\text{L}$  e o volume de aspiração da cubeta é de  $150\mu\text{L}$ . Desta forma, devido à pequena quantidade de amostra disponível, nas químicas CRE, AST/TGO e ALT/TGP, a quantidade total de amostra e de reagentes foi reduzida a  $\frac{1}{4}$  e para a dosagem da FA foi reduzida a  $\frac{1}{2}$  da quantidade preconizada pelo fabricante. É importante mencionar que esta redução foi devidamente testada durante a validação do equipamento e dos kits utilizados. Nas químicas URE e PT não houve modificação nos volumes da amostra e reagentes.

A leitura das químicas de cada indivíduo seguiu a seguinte ordem: branco, controles normal e patológico, calibradores (quando aplicável), amostras (única). A fim de se verificar a reprodutibilidade dos testes, foi escolhida aleatoriamente uma amostra / dia para ser lida novamente no dia seguinte. O branco tem a função de zerar o espectrofotômetro e o controle interno é aplicado na medida da imprecisão analítica e na verificação de desvios da calibração dos processos quantitativos. A calibração é um processo que visa verificar se a medida obtida por um instrumento é compatível com o esperado. Desta forma, para verificação do controle interno de qualidade dos ensaios foi utilizado o reagente Controlab Labtest Diagnóstica (dosagens normal e patológica) previamente às amostras de soro de animais de cada parâmetro e, posteriormente, os resultados das dosagens diárias foram plotados no gráfico de Levey-Jennings e aplicadas as devidas regras de controle.

A metodologia aplicada e a reação utilizada em cada um dos testes podem ser visualizadas na **Tabela 5**.

**Tabela 5:** Relação de analitos, metodologia aplicada, tipo de reação e comprimento de onda (reagentes Labtest)

ANALITO	METODOLOGIA	REAÇÃO	$\lambda$ (nm)
ALT / TGP	Cinética UV-IFCC: ALT catalisa a transferência do grupo amina da alanina para o cetoglutarato com formação de glutamato e piruvato que é reduzido a lactato. A diminuição da absorbância é proporcional à atividade da ALT na amostra.	Cinética Contínua Decrescente	340 nm
AST / TGO	Cinética UV-IFCC: AST catalisa a transferência do grupo amina do ácido aspártico para o cetoglutarato com formação de glutamato e oxalacetato que é reduzido a malato. A diminuição da absorbância é proporcional à atividade da AST na amostra.	Cinética Contínua Decrescente	340 nm
Creatinina K	Reação de Jaffé: a creatinina reage com o picrato alcalino formando um complexo de cor vermelha. A cor é proporcional à concentração de creatinina na amostra.	Cinética de Dois Pontos	510 nm
Fosfatase Alcalina	Browers e Mc modificado: a fosfatase alcalina em pH alcalino hidrolisa o p-nitrofenilfosfato liberando p-nitrofenol e fosfato inorgânico. A concentração de p-nitrofenol é proporcional à atividade enzimática da fosfatase alcalina na amostra.	Cinética Contínua	405 nm
Proteínas Totais	Biureto: íons cobre em meio alcalino reagem com as ligações peptídicas das proteínas séricas formando cor púrpura. A cor é proporcional à concentração de proteínas totais na amostra.	Ponto Final	545 nm
Uréia	Enzimático UV: a uréia é hidrolisada	Cinética de Dois	340 nm

---

pela urease produzindo amônia + CO <sub>2</sub> .	Pontos
A diminuição da absorbância é	
proporcional à concentração da uréia na	
amostra.	

---

**Fonte:** Labtest, sd.

Os kits das químicas, controles e calibradores utilizados para a realização dos ensaios foram adquiridos da Labtest Diagnóstica (Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil) e sua utilização foi realizada de acordo com os protocolos fornecidos pelo fabricante ([www.labtest.com.br](http://www.labtest.com.br)).

#### **4.6 Avaliação de parâmetros imunológicos**

Os ensaios *ex vivo* de imunofenotipagem de linfócitos do sangue foram realizados utilizando-se 150µL de sangue de cada animal coletadas em eppendorfs de 1,5mL previamente identificados, contendo EDTA como anticoagulante. O sangue foi transferido para tubos de poliestireno de 5mL (Falcon - BD, EUA), contendo 0,5µL ou 1,0µL do anticorpo monoclonal marcado com o fluorocromo específico (Isotiocianato de fluoresceína - FITC; Ficoeritrina - PE e Complexo proteína piridina clorofila - Percp) para o receptor celular de interesse (**Tabela 6**). Posteriormente, as amostras foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Após o período de incubação, as amostras de sangue foram submetidas à etapa de lise dos eritrócitos, utilizando-se 2mL de solução de lise comercial (Facs Lysing Solution - FLS - BD, EUA) diluída dez vezes em água tipo I. Posteriormente, foi adicionado 1mL de PBS 0,015M, pH 7,4 (SIGMA, EUA) e as amostras foram centrifugadas a 400 g por 10 minutos a 18°C (Centrífuga Beckman, Modelo J-6B, EUA). O sobrenadante foi descartado e as amostras lavadas com 3mL de PBS 0,015M, pH 7,4. Em seguida, as amostras foram fixadas com 200µL de solução fixadora (10 g/L de paraformaldeído; 1% de cacodilato de sódio; 6,67 g/L de cloreto de sódio, pH 7,2 - SIGMA, EUA). Após um período de 15 minutos a 4° C, os fenótipos celulares presentes em cada tubo foram determinados com o auxílio do citômetro de fluxo (FACScan - BD, EUA), sendo avaliados 20.000 eventos/tubo. Os resultados foram expressos em frequência percentual de células positivas para o marcador dentro da população de linfócitos totais.

**Tabela 6:** Anticorpos utilizados para imunofenotipagem de linfócitos circulantes

Marcador	Fluocromo	Clone	Volume	Funções
Anti-CD3e	PerCP	145-2C11	0,5µL	Associado ao receptor de células T (TCR). Exigido para expressão na superfície celular e para transdução de sinal pelo TCR. Expresso em timócitos e linfócitos T.
Anti-CD4	FITC	RM 4-5	0,5µL	Co-receptor para moléculas do complexo de histocompatibilidade principal de classe II. Expresso em subgrupos de timócitos, linfócitos T, monócitos e macrófagos.
Anti-CD8a	R-PE	53-67	1,0µL	Co-receptor para MHC de classe I. Expresso em subgrupos de timócitos e linfócitos T citotóxicos e / ou supressores.
Anti-CD19	FITC	6D5	0,5µL	Co-receptor de linfócitos B conjuntamente com CD21 e CD81. Expresso em linfócito B.

#### Anticorpos das marcas Sigma, BD e Caltag

**Fonte:** CD Reference Chart. 8th HLDA International Workshop, 2004. Mason et al. 2003, D'ambrosio et al. 2003, Ono et al. 2003.

#### 4.7 Considerações éticas

Este projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA / FIOCRUZ) com número de Licença LW-20/11 e ao Comitê Interno de Biossegurança do CPqRR (CIBio). As aprovações do projeto pelos referidos órgãos encontram-se respectivamente nos **Anexos 8.3 e 8.4**. Todos os procedimentos envolvendo a utilização de animais seguiram os “Princípios éticos para o uso de animais de laboratório” adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A

manutenção e o manejo dos animais foram também conduzidos respeitando-se o “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”, National Research Council (2008).

#### ***4.8 Análise estatística dos dados***

A análise estatística dos dados foi realizada com o auxílio do software (GraphPad Software, Inc, San Diego, CA) para comparação entre os grupos. Em cada linhagem de camundongo, a determinação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos e a avaliação dos perfis imunológicos foram realizadas por meio do cálculo dos valores mínimo, 25%, 50% - mediana, 75% e máximos obtidos, média global e  $\pm$  desvio padrão. Por se tratar de parâmetros em que há uma grande variabilidade entre os animais, todos os dados foram considerados de distribuição não paramétrica. Para comparação entre os sexos e biotérios foi utilizado o teste Mann - Whitney e para a comparação entre as linhagens foi utilizado o teste Kruskal - Wallis seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunns. O intervalo de confiança foi definido como 95% e em todos os casos as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para um valor de  $p < 0,05$ .

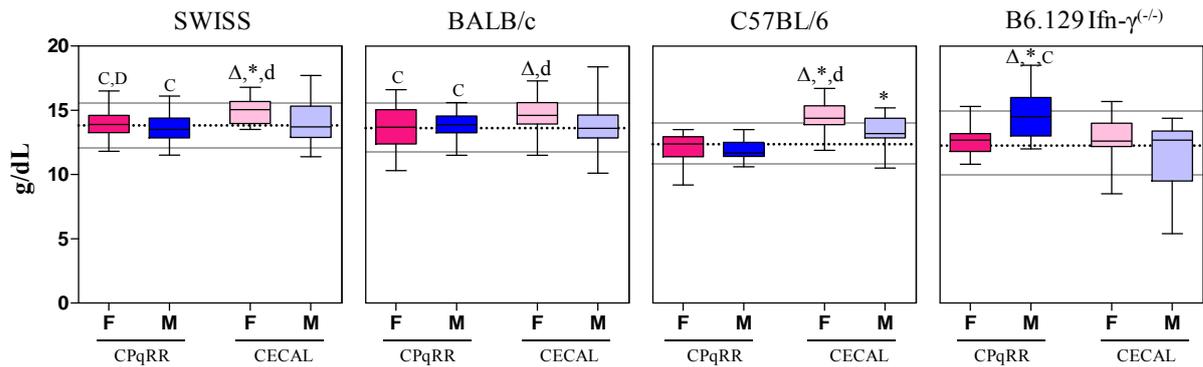
## **5 RESULTADOS**

### **5.1 Determinação de parâmetros hematológicos**

A determinação de parâmetros hematológicos foi realizada em amostras de sangue de camundongos fêmeas e machos das linhagens Swiss webster, BALB/c, C57BL/6 e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  provenientes do CPqRR e CECAL. Na série vermelha foram avaliados os parâmetros HGB, RBC, HCT, VCM, HCM e CHCM. Já na série branca foram analisadas a contagem global de WBC, contagem absoluta e percentual de linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos. Além disso, foi determinada também a contagem de PLT. É importante mencionar que as análises estatísticas foram realizadas entre os sexos em um mesmo biotério/linhagem, entre as linhagens em um mesmo sexo/biotério e entre animais do mesmo sexo/linhagem em biotérios distintos. Além disso, salienta-se que nas análises estatísticas o critério adotado na utilização da simbologia para demonstrar diferenças estatisticamente significativas foi a fixação do símbolo no maior valor da mediana.

Com relação à análise de HGB (**Figura 7**), comparando-se fêmeas e machos de uma mesma linhagem e biotério, foi observado que os machos da linhagem  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  provenientes do CPqRR apresentaram valores superiores aos das fêmeas. No CECAL, fêmeas das linhagens Swiss webster, BALB/c e C57BL/6 apresentaram valores superiores aos dos machos. Quando comparados animais do mesmo sexo e linhagem em biotérios distintos, os machos da linhagem  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  provenientes do CPqRR apresentaram valores superiores aos do CECAL. Contudo, as fêmeas da linhagem Swiss webster e fêmeas e machos de C57BL/6 provenientes do CECAL apresentaram valores maiores que seus correspondentes no CPqRR. Quando comparadas diferentes linhagens provenientes do CPqRR, as fêmeas de Swiss webster apresentaram valores superiores aos apresentados pelas fêmeas de C57BL/6 e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  e as fêmeas de BALB/c apresentaram valores superiores aos de C57BL/6. Já os machos de Swiss webster, BALB/c e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  apresentaram valores maiores que os machos de C57BL/6. Nas linhagens do CECAL, as fêmeas de Swiss webster, BALB/c e C57BL/6 apresentaram valores superiores aos das fêmeas de  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$ .

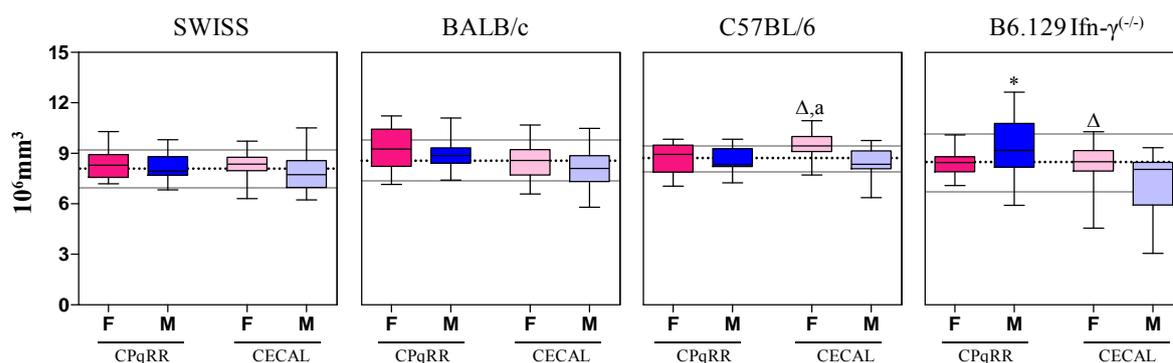
## HGB



**Figura 7:** Determinação de hemoglobina (HGB) em camundongos fêmeas (F) e machos (M) das linhagens Swiss webster (F=22; M=22), BALB/c (F=21; M=21), C57BL/6 (F=21; M=21) e Ifn- $\tilde{\alpha}^{(-/-)}$  (F=19; M=19) provenientes do CPqRR e CECAL. Os resultados estão expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo das populações avaliadas. As linhas tracejadas pretas correspondem à média global da linhagem e as linhas contínuas cinzas aos seus respectivos desvios padrões. ( $\Delta$ ): Diferenças estatisticamente significativas entre animais de sexo distinto da mesma linhagem no CPqRR e CECAL ( $p < 0,05$ ). (\*): Diferenças estatisticamente significativas entre animais do mesmo sexo/linhagem em biotérios distintos ( $p < 0,05$ ). (A, B, C, D): Diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em um mesmo sexo no CPqRR ( $p < 0,05$ ). (a, b, c, d): Diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em um mesmo sexo no CECAL ( $p < 0,05$ ).

Com relação à análise de RBC (**Figura 8**), comparando-se fêmeas e machos de uma mesma linhagem e biotério, foi observado que somente as fêmeas das linhagens C57BL/6 e Ifn- $\gamma^{(-/-)}$  provenientes do CECAL apresentaram valores superiores aos dos machos. Quando comparados animais do mesmo sexo e linhagem em biotérios distintos, os machos da linhagem Ifn- $\gamma^{(-/-)}$  provenientes do CPqRR apresentaram valores superiores aos do CECAL. Quando comparadas diferentes linhagens provenientes do CECAL, somente as fêmeas de C57BL/6 apresentaram valores maiores que as fêmeas de Swiss webster.

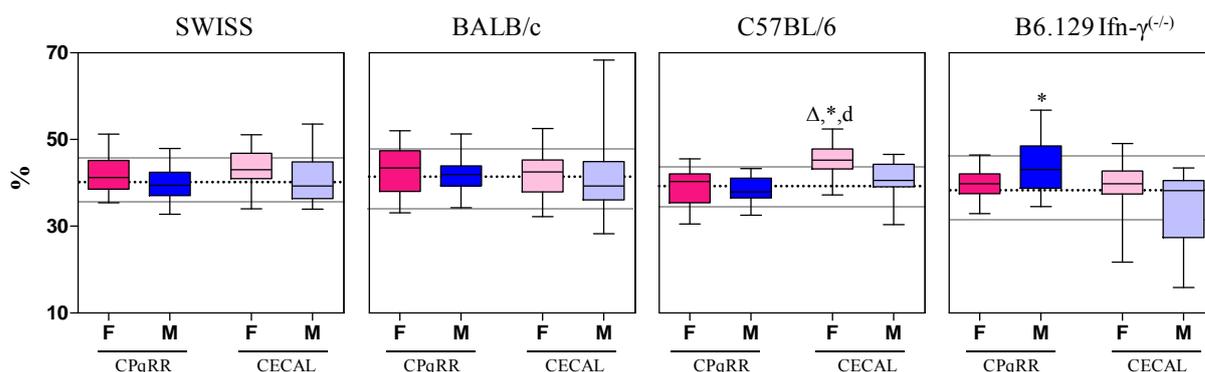
**RBC**



**Figura 8:** Determinação de eritrócitos (RBC) em camundongos fêmeas (F) e machos (M) das linhagens Swiss webster (F=22; M=22), BALB/c (F=21; M=21), C57BL/6 (F=21; M=21) e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  (F=19; M=19) provenientes do CPqRR e CECAL. Os resultados estão expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo das populações avaliadas. As linhas tracejadas pretas correspondem à média global da linhagem e as linhas contínuas cinzas aos seus respectivos desvios padrões. ( $\Delta$ ): Diferenças estatisticamente significativas entre animais de sexo distinto da mesma linhagem no CPqRR e CECAL ( $p < 0,05$ ). (\*): Diferenças estatisticamente significativas entre animais do mesmo sexo/linhagem em biotérios distintos ( $p < 0,05$ ). (A, B, C, D): Diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em um mesmo sexo no CPqRR ( $p < 0,05$ ). (a, b, c, d): Diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em um mesmo sexo no CECAL ( $p < 0,05$ ).

Com relação à análise de HCT (**Figura 9**), comparando-se fêmeas e machos de uma mesma linhagem e biotério, foi observado que somente as fêmeas da linhagem C57BL/6 provenientes do CECAL apresentaram valores superiores aos dos machos. Quando comparados animais do mesmo sexo e linhagem em biotérios distintos, os machos de  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  provenientes do CPqRR apresentaram valores maiores que os machos do CECAL e as fêmeas da linhagem C57BL/6 provenientes do CECAL apresentaram valores superiores aos das fêmeas do CPqRR. Quando comparadas diferentes linhagens provenientes do CECAL, somente as fêmeas de C57BL/6 apresentaram valores maiores que os apresentados pelas fêmeas de  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$ .

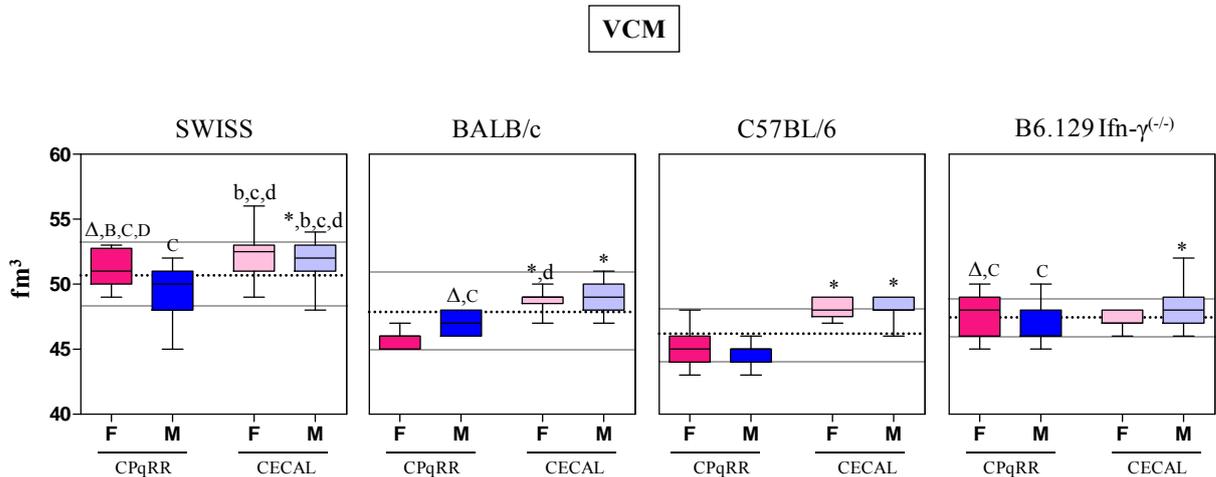
HCT



**Figura 9:** Determinação de hematócrito (HCT) em camundongos fêmeas (F) e machos (M) das linhagens Swiss webster (F=22; M=22), BALB/c (F=21; M=21), C57BL/6 (F=21; M=21) e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  (F=19; M=19) provenientes do CPqRR e CECAL. Os resultados estão expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo das populações avaliadas. As linhas tracejadas pretas correspondem à média global da linhagem e as linhas contínuas cinzas aos seus respectivos desvios padrões. ( $\Delta$ ): Diferenças estatisticamente significativas entre animais de sexo distinto da mesma linhagem no CPqRR e CECAL ( $p < 0,05$ ). (\*): Diferenças estatisticamente significativas entre animais do mesmo sexo/linhagem em biotérios distintos ( $p < 0,05$ ). (A, B, C, D): Diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em um mesmo sexo no CPqRR ( $p < 0,05$ ). (a, b, c, d): Diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em um mesmo sexo no CECAL ( $p < 0,05$ ).

Com relação à análise do VCM (**Figura 10**), comparando-se fêmeas e machos de uma mesma linhagem e biotério, foi observado que no CPqRR as fêmeas das linhagens Swiss webster e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  apresentaram valores superiores aos dos machos e que os machos de BALB/c apresentaram valores superiores aos das fêmeas. Quando comparados animais do mesmo sexo e linhagem em biotérios distintos, as fêmeas das linhagens BALB/c e C57BL/6 provenientes do CECAL apresentaram valores superiores aos das fêmeas do CPqRR. Em contrapartida, os machos de todas as linhagens estudadas provenientes do CECAL apresentaram valores maiores que seus correspondentes no CPqRR. Quando comparadas diferentes linhagens provenientes do CPqRR, as fêmeas de Swiss webster apresentaram valores superiores aos apresentados pelas fêmeas das outras três linhagens estudadas e as

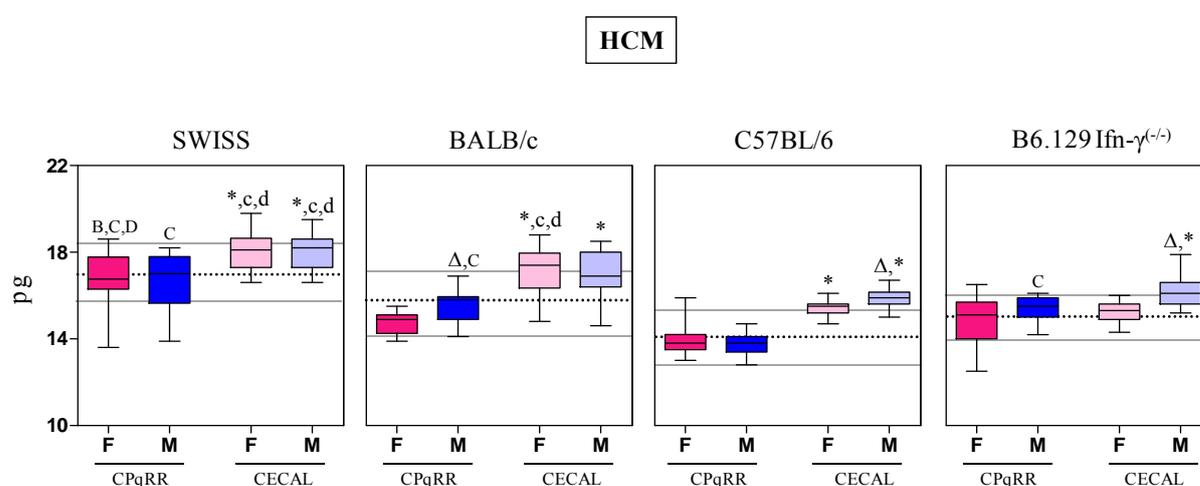
fêmeas de  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  apresentaram valores superiores aos das fêmeas de C57BL/6. Já os machos de Swiss webster, BALB/c e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  apresentaram valores maiores que os apresentados pelos machos de C57BL/6. Nas linhagens do CECAL, tanto as fêmeas quanto os machos de Swiss webster apresentaram valores superiores aos de BALB/c, C57BL/6 e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  e as fêmeas de BALB/c apresentaram valores superiores aos de  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$ .



**Figura 10:** Determinação do Volume Corpuscular Médio (VCM) em camundongos fêmeas (F) e machos (M) das linhagens Swiss webster (F=22; M=22), BALB/c (F=21; M=21), C57BL/6 (F=21; M=21) e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  (F=19; M=19) provenientes do CPqRR e CECAL. Os resultados estão expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo das populações avaliadas. As linhas tracejadas pretas correspondem à média global da linhagem e as linhas contínuas cinzas aos seus respectivos desvios padrões. ( $\Delta$ ): Diferenças estatisticamente significativas entre animais de sexo distinto da mesma linhagem no CPqRR e CECAL ( $p < 0,05$ ). (\*): Diferenças estatisticamente significativas entre animais do mesmo sexo/linhagem em biotérios distintos ( $p < 0,05$ ). (A, B, C, D): Diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em um mesmo sexo no CPqRR ( $p < 0,05$ ). (a, b, c, d): Diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em um mesmo sexo no CECAL ( $p < 0,05$ ).

Com relação à análise de HCM (**Figura 11**), comparando-se fêmeas e machos de uma mesma linhagem e biotério, foi observado que no CPqRR somente os machos de BALB/c apresentaram valores superiores aos das fêmeas. Já no CECAL, os machos das linhagens C57BL/6 e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  apresentaram valores superiores aos das fêmeas. Quando comparados

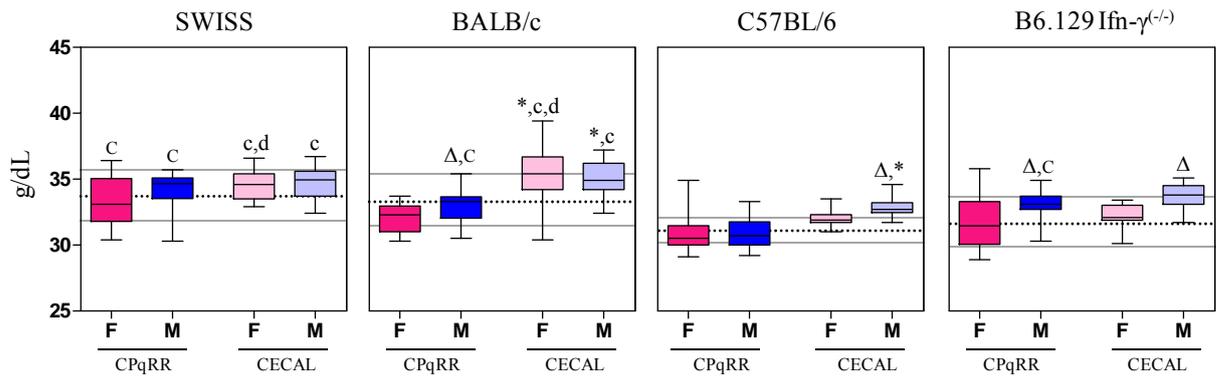
animais do mesmo sexo e linhagem em biotérios distintos, as fêmeas das linhagens Swiss webster, BALB/c e C57BL/6 provenientes do CECAL apresentaram valores superiores aos das fêmeas do CPqRR. Em contrapartida, os machos de todas as linhagens estudadas provenientes do CECAL apresentaram valores maiores que seus correspondentes no CPqRR. Quando comparadas diferentes linhagens provenientes do CPqRR, as fêmeas de Swiss webster apresentaram valores superiores aos das fêmeas das outras três linhagens estudadas e os machos de Swiss webster, BALB/c e  $Ifn-\gamma^{(-/-)}$  apresentaram valores maiores que os machos de C57BL/6. Nas linhagens do CECAL, tanto as fêmeas quanto os machos de Swiss webster e as fêmeas de BALB/c apresentaram valores superiores aos seus correspondentes das linhagens C57BL/6 e  $Ifn-\gamma^{(-/-)}$ .



**Figura 11:** Determinação de Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) em camundongos fêmeas (F) e machos (M) das linhagens Swiss webster (F=22; M=22), BALB/c (F=21; M=21), C57BL/6 (F=21; M=21) e  $Ifn-\gamma^{(-/-)}$  (F=19; M=19) provenientes do CPqRR e CECAL. Os resultados estão expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo das populações avaliadas. As linhas tracejadas pretas correspondem à média global da linhagem e as linhas contínuas cinzas aos seus respectivos desvios padrões. ( $\Delta$ ): Diferenças estatisticamente significativas entre animais de sexo distinto da mesma linhagem no CPqRR e CECAL ( $p < 0,05$ ). (\*): Diferenças estatisticamente significativas entre animais do mesmo sexo/linhagem em biotérios distintos ( $p < 0,05$ ). (A, B, C, D): Diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em um mesmo sexo no CPqRR ( $p < 0,05$ ). (a, b, c, d): Diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em um mesmo sexo no CECAL ( $p < 0,05$ ).

Com relação à análise da CHCM (**Figura 12**), comparando-se fêmeas e machos de uma mesma linhagem e biotério, foi observado no CPqRR que os machos das linhagens BALB/c e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-)}$  apresentaram valores superiores aos das fêmeas. No CECAL, os machos das linhagens C57BL/6 e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-)}$  apresentaram valores superiores aos das fêmeas. Quando comparados animais do mesmo sexo e linhagem em biotérios distintos, fêmeas e machos da linhagem BALB/c e machos da linhagem C57BL/6 provenientes do CECAL apresentaram valores superiores aos dos seus correspondentes no CPqRR. Quando comparadas diferentes linhagens provenientes do CPqRR, as fêmeas de Swiss webster apresentaram valores maiores que os apresentados pelas fêmeas de C57BL/6. Já os machos de Swiss webster, BALB/c e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-)}$  apresentaram valores superiores aos dos machos de C57BL/6. Nas linhagens do CECAL, as fêmeas de Swiss webster e BALB/c apresentaram valores maiores que as fêmeas de C57BL/6 e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-)}$ , enquanto que os machos de Swiss webster e BALB/c apresentaram valores superiores aos dos machos de C57BL/6.

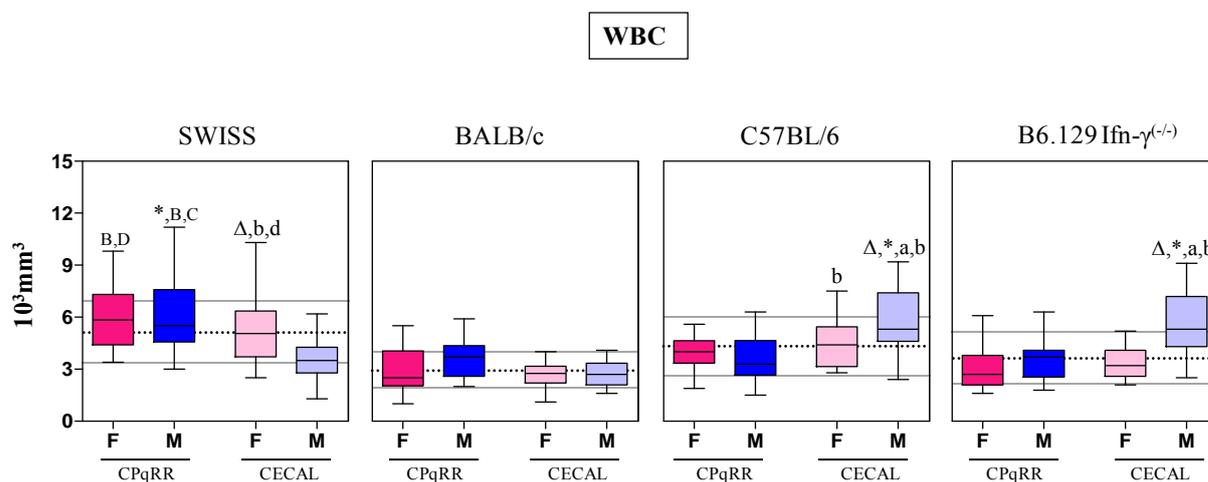
CHCM



**Figura 12:** Determinação da Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) em camundongos fêmeas (F) e machos (M) das linhagens Swiss webster (F=22; M=22), BALB/c (F=21; M=21), C57BL/6 (F=21; M=21) e Ifn- $\gamma^{(-/-)}$  (F=19; M=19) provenientes do CPqRR e CECAL. Os resultados estão expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo das populações avaliadas. As linhas tracejadas pretas correspondem à média global da linhagem e as linhas contínuas cinzas aos seus respectivos desvios padrões. ( $\Delta$ ): Diferenças estatisticamente significativas entre animais de sexo distinto da mesma linhagem no CPqRR e CECAL ( $p < 0,05$ ). (\*): Diferenças estatisticamente significativas entre animais do mesmo sexo/linhagem em biotérios distintos ( $p < 0,05$ ). (A, B, C, D): Diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em um mesmo sexo no CPqRR ( $p < 0,05$ ). (a, b, c, d): Diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em um mesmo sexo no CECAL ( $p < 0,05$ ).

Com relação à análise da contagem global de WBC (**Figura 13**), comparando-se fêmeas e machos de uma mesma linhagem e biotério, foi observado que no CECAL as fêmeas de Swiss webster apresentaram valores superiores aos dos machos e que os machos de C57BL/6 e Ifn- $\gamma^{(-/-)}$  apresentaram valores superiores aos das fêmeas. Quando comparados animais do mesmo sexo e linhagem em biotérios distintos, os machos da linhagem Swiss webster provenientes do CPqRR apresentaram valores superiores aos dos machos do CECAL e que os machos de C57BL/6 e Ifn- $\gamma^{(-/-)}$  provenientes do CECAL apresentaram valores superiores aos dos machos do CPqRR. Quando comparadas diferentes linhagens, as fêmeas de Swiss webster provenientes do CPqRR apresentaram valores maiores que as fêmeas de BALB/c e Ifn- $\gamma^{(-/-)}$  e os machos de Swiss webster apresentaram valores maiores que os

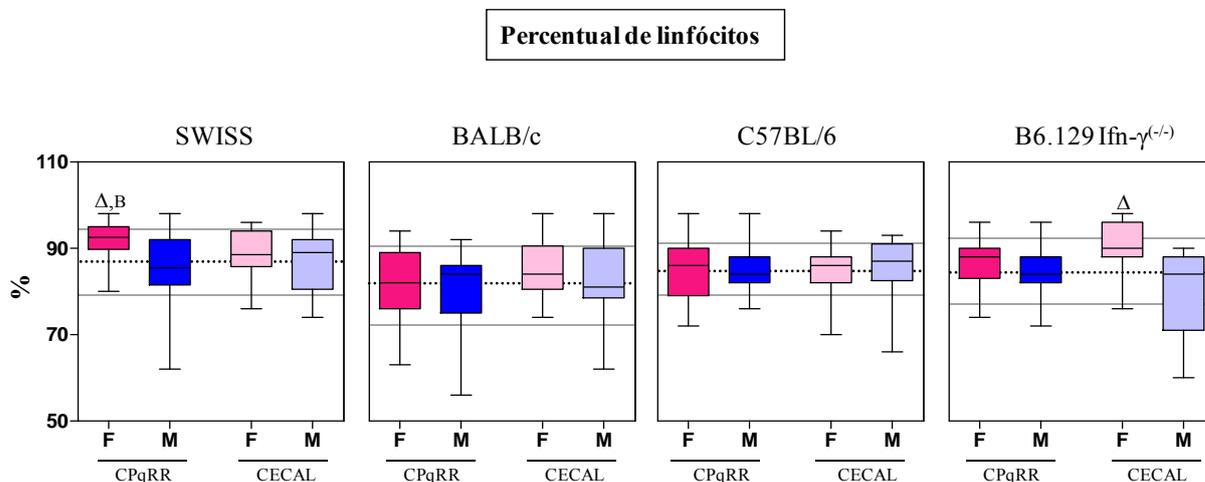
machos de BALB/c e C57BL/6. No CECAL, as fêmeas de Swiss webster também apresentaram valores superiores aos apresentados pelas fêmeas de BALB/c e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  e as fêmeas de C57BL/6 apresentaram valores maiores que as fêmeas de BALB/c. Os machos de C57BL/6 e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  do CECAL apresentaram valores superiores aos dos machos de Swiss webster e BALB/.



**Figura 13:** Determinação da contagem global de leucócitos (WBC) em camundongos fêmeas (F) e machos (M) das linhagens Swiss webster (F=22; M=22), BALB/c (F=21; M=21), C57BL/6 (F=21; M=21) e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  (F=19; M=19) provenientes do CPqRR e CECAL. Os resultados estão expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo das populações avaliadas. As linhas tracejadas pretas correspondem à média global da linhagem e as linhas contínuas cinzas aos seus respectivos desvios padrões. ( $\Delta$ ): Diferenças estatisticamente significativas entre animais de sexo distinto da mesma linhagem no CPqRR e CECAL ( $p < 0,05$ ). (\*): Diferenças estatisticamente significativas entre animais do mesmo sexo/linhagem em biotérios distintos ( $p < 0,05$ ). (A, B, C, D): Diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em um mesmo sexo no CPqRR ( $p < 0,05$ ). (a, b, c, d): Diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em um mesmo sexo no CECAL ( $p < 0,05$ ).

Com relação à análise do percentual de linfócitos (**Figura 14**), comparando-se fêmeas e machos de uma mesma linhagem e biotério, foi observado que as fêmeas da linhagem Swiss webster do CPqRR apresentaram valores superiores aos dos machos. No CECAL as fêmeas de  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  apresentaram valores superiores aos dos machos. Quando comparados animais do

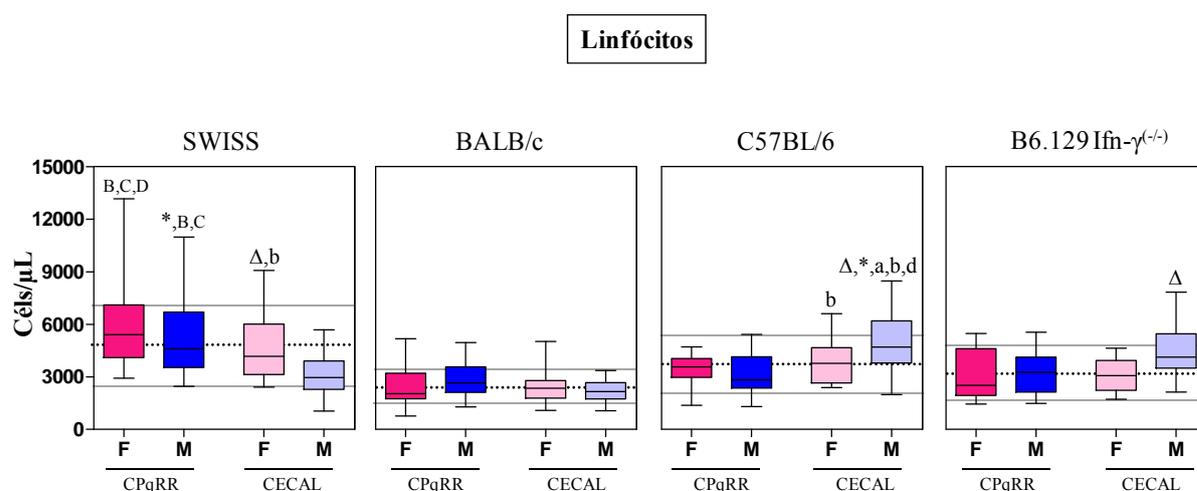
mesmo sexo e linhagem em biotérios distintos, não houve diferença estatisticamente significativa entre as linhagens. Quando comparadas diferentes linhagens, somente as fêmeas de Swiss webster provenientes do CPqRR apresentaram valores maiores que as fêmeas de BALB/c.



**Figura 14:** Determinação do percentual de linfócitos em camundongos fêmeas (F) e machos (M) das linhagens Swiss webster (F=22; M=22), BALB/c (F=21; M=21), C57BL/6 (F=21; M=21) e  $Ifn-\gamma^{(-/-)}$  (F=19; M=19) provenientes do CPqRR e CECAL. Os resultados estão expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo das populações avaliadas. As linhas tracejadas pretas correspondem à média global da linhagem e as linhas contínuas cinzas aos seus respectivos desvios padrões. ( $\Delta$ ): Diferenças estatisticamente significativas entre animais de sexo distinto da mesma linhagem no CPqRR e CECAL ( $p < 0,05$ ). (\*): Diferenças estatisticamente significativas entre animais do mesmo sexo/linhagem em biotérios distintos ( $p < 0,05$ ). (A, B, C, D): Diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em um mesmo sexo no CPqRR ( $p < 0,05$ ). (a, b, c, d): Diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em um mesmo sexo no CECAL ( $p < 0,05$ ).

Com relação à análise da contagem de linfócitos (**Figura 15**), comparando-se fêmeas e machos de uma mesma linhagem e biotério, foi observado que, no CECAL, as fêmeas de Swiss webster apresentaram valores superiores aos dos machos e que os machos de C57BL/6 e  $Ifn-\gamma^{(-/-)}$  apresentaram valores superiores aos das fêmeas. Quando comparados animais do mesmo sexo e linhagem em biotérios distintos, os machos de Swiss webster provenientes do

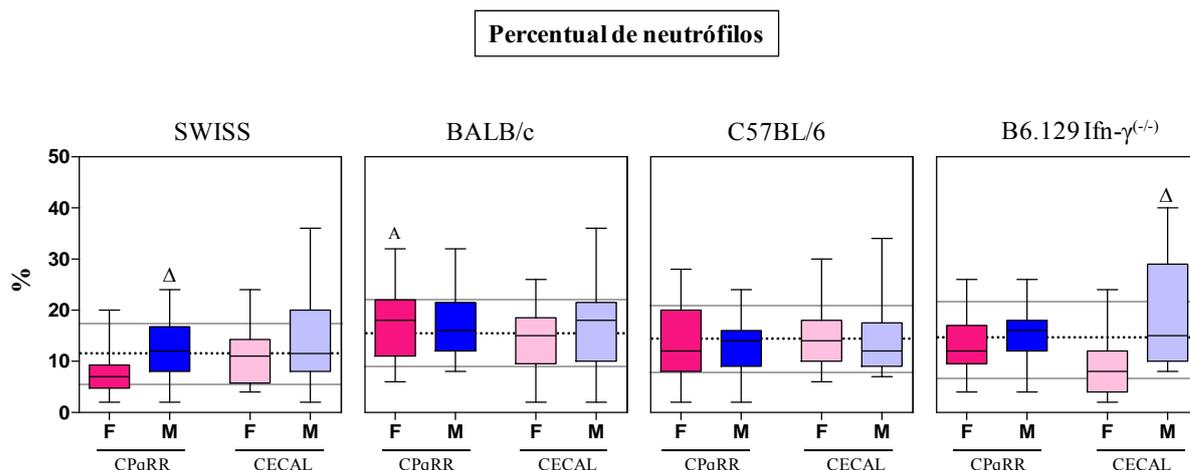
CPqRR apresentaram valores maiores que os machos do CECAL e os machos de C57BL/6 do CECAL apresentaram valores superiores aos dos machos do CPqRR. Quando comparadas diferentes linhagens provenientes do CPqRR, as fêmeas de Swiss webster apresentaram valores maiores que as fêmeas das demais linhagens e os machos desta mesma linhagem apresentaram valores maiores que os machos de BALB/c e C57BL/6. Já no CECAL, as fêmeas de Swiss webster e C57BL/6 apresentaram valores superiores aos das fêmeas de BALB/c e os machos de C57BL/6 apresentaram valores superiores aos dos machos das três linhagens estudadas.



**Figura 15:** Determinação da contagem de linfócitos em camundongos fêmeas (F) e machos (M) das linhagens Swiss webster (F=22; M=22), BALB/c (F=21; M=21), C57BL/6 (F=21; M=21) e Ifn- $\gamma^{(-/-)}$  (F=19; M=19) provenientes do CPqRR e CECAL. Os resultados estão expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo das populações avaliadas. As linhas tracejadas pretas correspondem à média global da linhagem e as linhas contínuas cinzas aos seus respectivos desvios padrões. ( $\Delta$ ): Diferenças estatisticamente significativas entre animais de sexo distinto da mesma linhagem no CPqRR e CECAL ( $p < 0,05$ ). (\*): Diferenças estatisticamente significativas entre animais do mesmo sexo/linhagem em biotérios distintos ( $p < 0,05$ ). (A, B, C, D): Diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em um mesmo sexo no CPqRR ( $p < 0,05$ ). (a, b, c, d): Diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em um mesmo sexo no CECAL ( $p < 0,05$ ).

Com relação à análise do percentual de neutrófilos (**Figura 16**), comparando-se

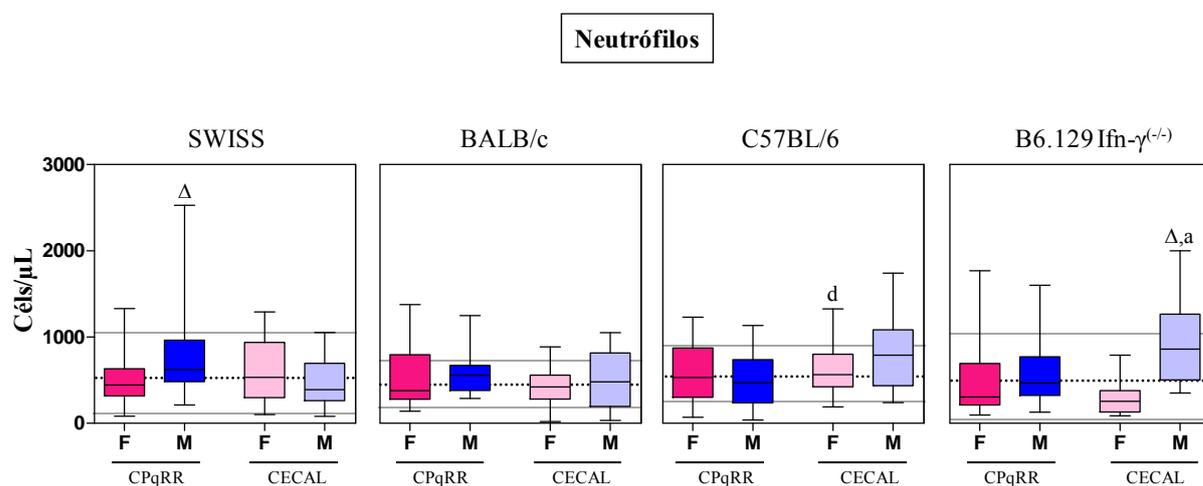
fêmeas e machos de uma mesma linhagem e biotério, foi observado que os machos de Swiss webster provenientes do CPqRR apresentaram valores superiores aos das fêmeas. No CECAL, os machos de  $\text{Ifn-}\gamma^{(-)}$  apresentaram valores superiores aos das fêmeas. Quando comparados animais do mesmo sexo e linhagem em biotérios distintos, não houve diferença estatisticamente significativa entre as linhagens. Quando comparadas diferentes linhagens, somente as fêmeas de BALB/c provenientes do CPqRR apresentaram valores superiores aos das fêmeas de Swiss webster.



**Figura 16:** Determinação do percentual de neutrófilos em camundongos fêmeas (F) e machos (M) das linhagens Swiss webster (F=22; M=22), BALB/c (F=21; M=21), C57BL/6 (F=21; M=21) e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-)}$  (F=19; M=19) provenientes do CPqRR e CECAL. Os resultados estão expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo das populações avaliadas. As linhas tracejadas pretas correspondem à média global da linhagem e as linhas contínuas cinzas aos seus respectivos desvios padrões. (Δ): Diferenças estatisticamente significativas entre animais de sexo distinto da mesma linhagem no CPqRR e CECAL ( $p < 0,05$ ). (\*): Diferenças estatisticamente significativas entre animais do mesmo sexo/linhagem em biotérios distintos ( $p < 0,05$ ). (A, B, C, D): Diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em um mesmo sexo no CPqRR ( $p < 0,05$ ). (a, b, c, d): Diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em um mesmo sexo no CECAL ( $p < 0,05$ ).

Com relação à análise da contagem de neutrófilos (**Figura 17**), comparando-se fêmeas e machos de uma mesma linhagem e biotério, foi observado que os machos de Swiss webster

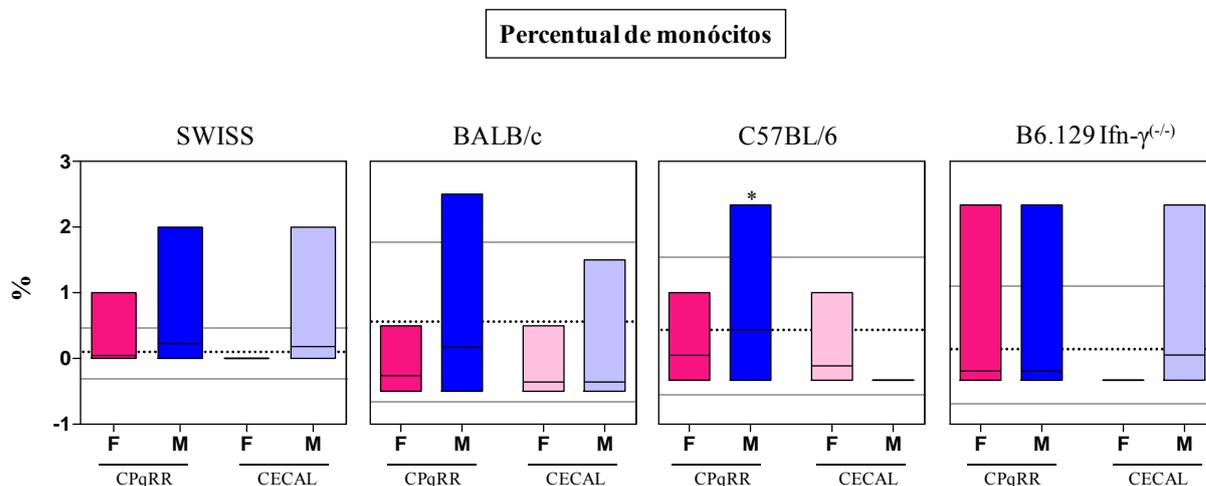
provenientes do CPqRR apresentaram valores superiores aos das fêmeas. No CECAL, os machos de  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  apresentaram valores superiores aos das fêmeas. Quando comparados animais do mesmo sexo e linhagem em biotérios distintos, não houve diferença estatisticamente significativa entre as linhagens. Quando comparadas diferentes linhagens no CECAL, as fêmeas de C57BL/6 apresentaram valores superiores aos das fêmeas de  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  e os machos de  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  apresentaram valores maiores que os machos de Swiss webster.



**Figura 17:** Determinação da contagem de neutrófilos em camundongos fêmeas (F) e machos (M) das linhagens Swiss webster (F=22; M=22), BALB/c (F=21; M=21), C57BL/6 (F=21; M=21) e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  (F=19; M=19) provenientes do CPqRR e CECAL. Os resultados estão expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo das populações avaliadas. As linhas tracejadas pretas correspondem à média global da linhagem e as linhas contínuas cinzas aos seus respectivos desvios padrões. ( $\Delta$ ): Diferenças estatisticamente significativas entre animais de sexo distinto da mesma linhagem no CPqRR e CECAL ( $p < 0,05$ ). (\*): Diferenças estatisticamente significativas entre animais do mesmo sexo/linhagem em biotérios distintos ( $p < 0,05$ ). (A, B, C, D): Diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em um mesmo sexo no CPqRR ( $p < 0,05$ ). (a, b, c, d): Diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em um mesmo sexo no CECAL ( $p < 0,05$ ).

Com relação à análise do percentual de monócitos (**Figura 18**), comparando-se fêmeas e machos de uma mesma linhagem e biotério, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os sexos. Quando comparados animais do mesmo sexo e linhagem em

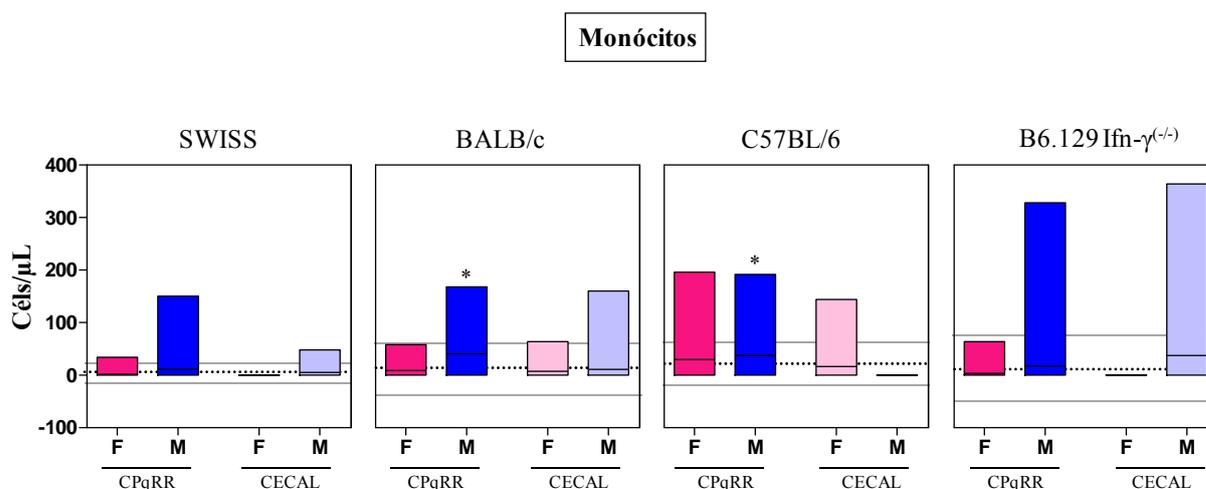
biotérios distintos, somente os machos de C57BL/6 provenientes do CPqRR apresentaram valores superiores aos dos machos do CECAL. Quando comparadas diferentes linhagens em um mesmo sexo/biotério, também não houve diferença estatisticamente significativa entre as linhagens estudadas.



**Figura 18:** Determinação do percentual de monócitos em camundongos fêmeas (F) e machos (M) das linhagens Swiss webster (F=22; M=22), BALB/c (F=21; M=21), C57BL/6 (F=21; M=21) e Ifn- $\gamma^{(-/-)}$  (F=19; M=19) provenientes do CPqRR e CECAL. Os resultados estão expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 50% - mediana e máximo das populações avaliadas. As linhas tracejadas pretas correspondem à média global da linhagem e as linhas contínuas cinzas aos seus respectivos desvios padrões. ( $\Delta$ ): Diferenças estatisticamente significativas entre animais de sexo distinto da mesma linhagem no CPqRR e CECAL ( $p < 0,05$ ). (\*): Diferenças estatisticamente significativas entre animais do mesmo sexo/linhagem em biotérios distintos ( $p < 0,05$ ). (A, B, C, D): Diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em um mesmo sexo no CPqRR ( $p < 0,05$ ). (a, b, c, d): Diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em um mesmo sexo no CECAL ( $p < 0,05$ ).

Com relação à análise da contagem de monócitos (**Figura 19**), comparando-se fêmeas e machos de uma mesma linhagem e biotério, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os sexos. Quando comparados animais do mesmo sexo e linhagem em biotérios distintos, somente os machos de BALB/c e C57BL/6 provenientes do CPqRR apresentaram valores superiores aos dos machos do CECAL. Quando comparadas diferentes

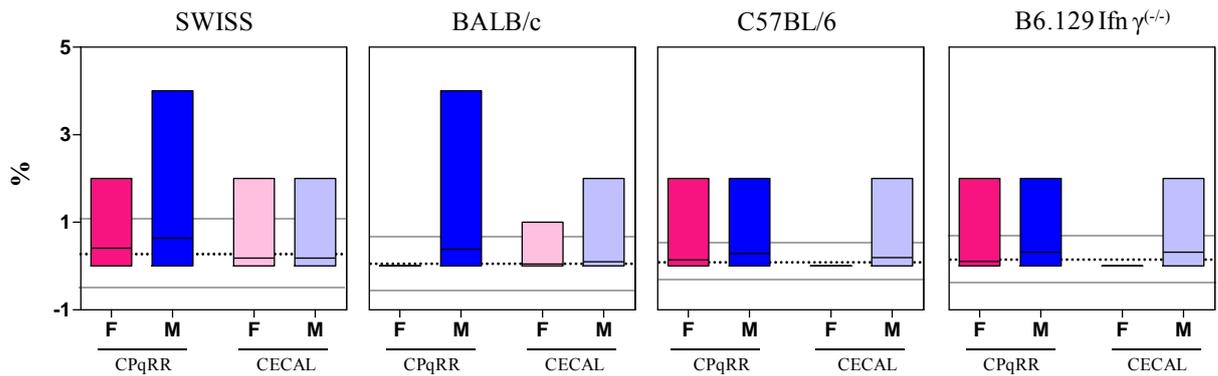
linhagens em um mesmo sexo/biotério, também não houve diferença estatisticamente significativa entre as linhagens estudadas.



**Figura 19:** Determinação da contagem de monócitos em camundongos fêmeas (F) e machos (M) das linhagens Swiss webster (F=22; M=22), BALB/c (F=21; M=21), C57BL/6 (F=21; M=21) e Ifn- $\gamma^{(-/-)}$  (F=19; M=19) provenientes do CPqRR e CECAL. Os resultados estão expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 50% - mediana e máximo das populações avaliadas. As linhas tracejadas pretas correspondem à média global da linhagem e as linhas contínuas cinzas aos seus respectivos desvios padrões. ( $\Delta$ ): Diferenças estatisticamente significativas entre animais de sexo distinto da mesma linhagem no CPqRR e CECAL ( $p < 0,05$ ). (\*): Diferenças estatisticamente significativas entre animais do mesmo sexo/linhagem em biotérios distintos ( $p < 0,05$ ). (A, B, C, D): Diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em um mesmo sexo no CPqRR ( $p < 0,05$ ). (a, b, c, d): Diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em um mesmo sexo no CECAL ( $p < 0,05$ ).

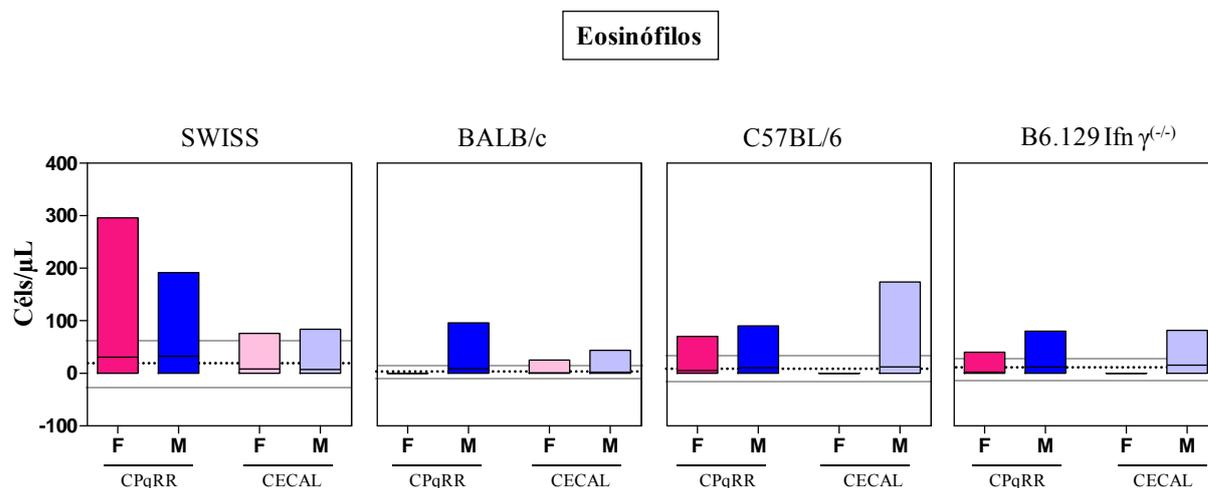
Com relação à análise do percentual de eosinófilos (**Figura 20**) não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os sexos, biotérios e linhagens.

Percentual de eosinófilos



**Figura 20:** Determinação do percentual de eosinófilos em camundongos fêmeas (F) e machos (M) das linhagens Swiss webster (F=22; M=22), BALB/c (F=21; M=21), C57BL/6 (F=21; M=21) e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  (F=19; M=19) provenientes do CPqRR e CECAL. Os resultados estão expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 50% - mediana e máximo das populações avaliadas. As linhas tracejadas pretas correspondem à média global da linhagem e as linhas contínuas cinzas aos seus respectivos desvios padrões. ( $\Delta$ ): Diferenças estatisticamente significativas entre animais de sexo distinto da mesma linhagem no CPqRR e CECAL ( $p < 0,05$ ). (\*): Diferenças estatisticamente significativas entre animais do mesmo sexo/linhagem em biotérios distintos ( $p < 0,05$ ). (A, B, C, D): Diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em um mesmo sexo no CPqRR ( $p < 0,05$ ). (a, b, c, d): Diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em um mesmo sexo no CECAL ( $p < 0,05$ ).

Com relação à análise da contagem de eosinófilos (**Figura 21**) não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os sexos, biotérios e linhagens.

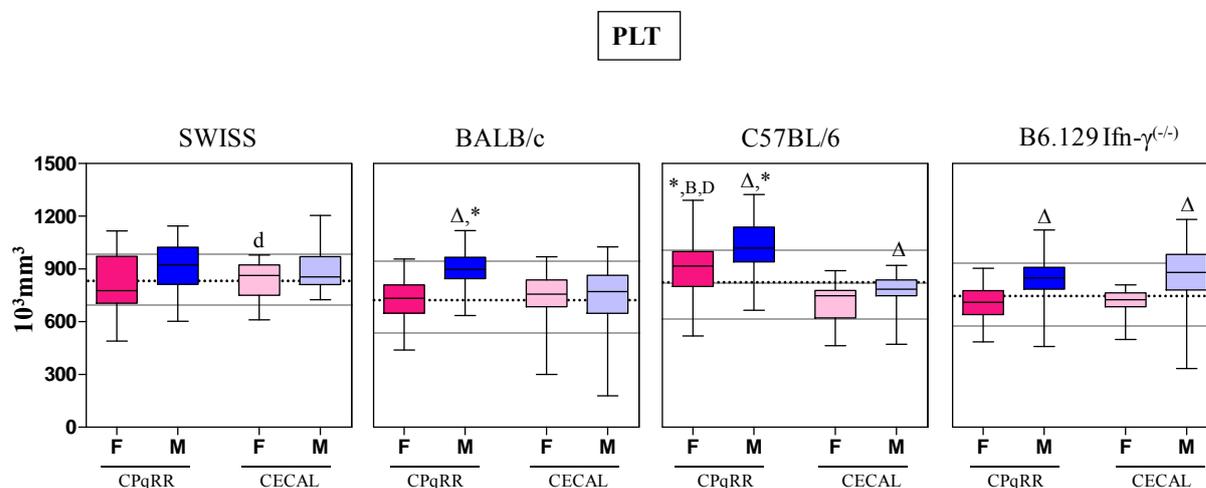


**Figura 21:** Determinação da contagem de eosinófilos em camundongos fêmeas (F) e machos (M) das linhagens Swiss webster (F=22; M=22), BALB/c (F=21; M=21), C57BL/6 (F=21; M=21) e Ifn- $\gamma^{(-/-)}$  (F=19; M=19) provenientes do CPqRR e CECAL. Os resultados estão expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 50% - mediana e máximo das populações avaliadas. As linhas tracejadas pretas correspondem à média global da linhagem e as linhas contínuas cinzas aos seus respectivos desvios padrões. ( $\Delta$ ): Diferenças estatisticamente significativas entre animais de sexo distinto da mesma linhagem no CPqRR e CECAL ( $p < 0,05$ ). (\*): Diferenças estatisticamente significativas entre animais do mesmo sexo/linhagem em biotérios distintos ( $p < 0,05$ ). (A, B, C, D): Diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em um mesmo sexo no CPqRR ( $p < 0,05$ ). (a, b, c, d): Diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em um mesmo sexo no CECAL ( $p < 0,05$ ).

Com relação à análise da contagem de basófilos, não foi encontrada esta população de células nas amostras de sangue avaliadas neste estudo.

Com relação à análise da contagem de PLT (**Figura 22**), comparando-se fêmeas e machos de uma mesma linhagem e biotério, foi observado que os machos das linhagens BALB/c, C57BL/6 e Ifn- $\gamma^{(-/-)}$  provenientes do CPqRR apresentaram valores superiores aos das fêmeas. Já no CECAL, os machos das linhagens C57BL/6 e Ifn- $\gamma^{(-/-)}$  apresentaram valores superiores aos das fêmeas. Quando comparados animais do mesmo sexo e linhagem em biotérios distintos, os machos das linhagens BALB/c e fêmeas e machos de C57BL/6 provenientes do CPqRR apresentaram valores superiores aos dos seus correspondentes no

CECAL. Quando comparadas diferentes linhagens provenientes do CPqRR, as fêmeas de C57BL/6 apresentaram valores superiores aos apresentados pelas fêmeas de BALB/c e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$ . Nas linhagens do CECAL, somente as fêmeas de Swiss webster apresentaram valores superiores aos das fêmeas de  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$ .



**Figura 22:** Determinação da contagem de plaquetas (PLT) em camundongos fêmeas (F) e machos (M) das linhagens Swiss webster (F=22; M=22), BALB/c (F=21; M=21), C57BL/6 (F=21; M=21) e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  (F=19; M=19) provenientes do CPqRR e CECAL. Os resultados estão expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo das populações avaliadas. As linhas tracejadas pretas correspondem à média global da linhagem e as linhas contínuas cinzas aos seus respectivos desvios padrões. ( $\Delta$ ): Diferenças estatisticamente significativas entre animais de sexo distinto da mesma linhagem no CPqRR e CECAL ( $p < 0,05$ ). (\*): Diferenças estatisticamente significativas entre animais do mesmo sexo/linhagem em biotérios distintos ( $p < 0,05$ ). (A, B, C, D): Diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em um mesmo sexo no CPqRR ( $p < 0,05$ ). (a, b, c, d): Diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em um mesmo sexo no CECAL ( $p < 0,05$ ).

As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) encontradas na determinação de HGB, RBC, HCT, VCM, HCM, CHCM e PLT referente às comparações realizadas entre animais de sexos distintos em uma mesma linhagem e biotério se encontram na **Tabela 7**.

**Tabela 7:** Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) encontradas na determinação de HGB, RBC, HCT, VCM, HCM, CHCM e PLT quando comparados animais de sexos distintos em uma mesma linhagem e biotério

Linhagem/Biotério	Parâmetro						
	HGB	RBC	HCT	VCM	HCM	CHCM	PLT
<b>CPqRR</b>							
Swiss webster				F > M			
BALB/c				F < M	F < M	F < M	F < M
C57BL/6							F < M
Ifn- $\gamma^{(-/-)}$	F < M			F > M		F < M	F < M
<b>CECAL</b>							
Swiss webster	F > M						
BALB/c	F > M						
C57BL/6	F > M	F > M	F > M		F < M	F < M	F < M
Ifn- $\gamma^{(-/-)}$		F > M			F < M	F < M	F < M

Fonte: Adaptado de Wirth-Dzieciolowska et al, 2009.

F - fêmeas; M - machos.

As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) encontradas na determinação da contagem global de WBC, número percentual e absoluto de LINF, NEUT, MONO e EOSI referente às comparações realizadas entre animais de sexos distintos em uma mesma linhagem e biotério se encontram na **Tabela 8**.

**Tabela 8:** Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) encontradas na determinação da contagem global de WBC, número percentual e absoluto de LINF, NEUT, MONO e EOSI quando comparados animais de sexos distintos em uma mesma linhagem e biotério

Linhagem/ Biotério	Parâmetro								
	WBC	% LINF	LINF	% NEUT	NEUT	% MONO	MONO	% EOSI	EOSI
<b>CPqRR</b>									
Swiss webster		F > M		F < M	F < M				
BALB/c									
C57BL/6									
Ifn- $\gamma^{(-/-)}$									
<b>CECAL</b>									
Swiss webster	F > M		F > M						
BALB/c									
C57BL/6	F < M		F < M						
Ifn- $\gamma^{(-/-)}$	F < M	F > M	F < M	F < M	F < M				

Fonte: Adaptado de Wirth-Dzieciolowska et al, 2009.

F - fêmeas; M - machos.

As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) encontradas na determinação de HGB, RBC, HCT, VCM, HCM, CHCM e PLT referente às comparações realizadas entre

animais do mesmo sexo e linhagem em biotérios distintos se encontram na **Tabela 9**.

**Tabela 9:** Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) encontradas na determinação de HGB, RBC, HCT, VCM, HCM, CHCM e PLT quando comparados animais do mesmo sexo e linhagem em biotérios distintos

Linhagem/Sexo	Parâmetro						
	HGB	RBC	HCT	VCM	HCM	CHCM	PLT
Swiss webster							
F	R < C				R < C		
M				R < C	R < C		
BALB/c							
F	R < C			R < C	R < C	R < C	
M				R < C	R < C	R < C	R > C
C57BL/6							
F	R < C		R < C	R < C	R < C		R > C
M	R < C			R < C	R < C	R < C	R > C
Ifn- $\gamma^{(-/-)}$							
F							
M	R > C	R > C	R > C	R < C	R < C		

**Fonte:** Adaptado de Wirth-Dzieciłowska et al, 2009.

F - fêmeas; M - machos.

R - CPqRR

C - CECAL

As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) encontradas na determinação da contagem global de WBC, número percentual e absoluto de LINF, NEUT, MONO e EOSI referente às comparações realizadas entre animais do mesmo sexo e linhagem em biotérios distintos se encontram na **Tabela 10**.

**Tabela 10:** Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) encontradas na determinação da contagem global de WBC, número percentual e absoluto de LINF, NEUT, MONO e EOSI quando comparados animais do mesmo sexo e linhagem em biotérios distintos

Linhagem/ Sexo	Parâmetro								
	WBC	% LINF	LINF	% NEUT	NEUT	% MONO	MONO	% EOSI	EOSI
Swiss webster									
F									
M	R > C		R > C						
BALB/c									
F									
M							R > C		
C57BL/6									
F									
M	R < C		R < C			R > C	R > C		
Ifn- $\gamma^{(-/-)}$									
F									
M	R < C								

Fonte: Adaptado de Wirth-Dzieciolowska et al, 2009.

F - fêmeas; M - machos.

R - CPqRR

C - CECAL

As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) encontradas na determinação de HGB, RBC, HCT, VCM, HCM, CHCM e PLT referente às comparações realizadas entre animais do mesmo sexo e biotério e linhagens distintas se encontram na **Tabela 11**.

**Tabela 11:** Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) encontradas na determinação de HGB, RBC, HCT, VCM, HCM, CHCM e PLT quando comparados animais do mesmo sexo e biotério e linhagens distintas

Biotério/Sexo	Parâmetro						
	HGB	RBC	HCT	VCM	HCM	CHCM	PLT
<b>CPqRR</b>							
Fêmea	A,B>C			A>B,C,D C<D	A>B,C,D	A>C	B,D>C
Macho	A,B,D>C			A,B,D>C	A,B,D>C	A,B,D>C	
<b>CECAL</b>							
Fêmea	A,B,C>D	A<C	C>D	A>B,C,D B>D	A>C,D B>C,D	A>C,D B>C,D	A>D
Macho				A>B,C,D	A<C,D	A,B>C	

Fonte: Adaptado de Wirth-Dzieciolowska et al, 2009.

A - Swiss webster

B - BALB/c

C - C57BL/6

D - Ifn- $\gamma^{(-/-)}$

As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) encontradas na determinação da contagem global de WBC, número percentual e absoluto de LINF, NEUT, MONO e EOSI referente às comparações realizadas entre animais do mesmo sexo e biotério e linhagens distintas se encontram na **Tabela 12**.

**Tabela 12:** Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) encontradas na determinação da contagem global de WBC, número percentual e absoluto de LINF, NEUT, MONO e EOSI quando comparados animais do mesmo sexo e linhagem em biotérios distintos

Linhagem/ Sexo	Parâmetro								
	WBC	% LINF	LINF	% NEUT	NEUT	% MONO	MONO	% EOSI	EOSI
<b>CPqRR</b>									
Fêmea	A>B,D	A>B	A>B,C,D	B>A					
Macho	A,B,C		A>B,C						
<b>CECAL</b>									
Fêmea	A>B,D B<C		B<A,C		C>D				
Macho	A,B>C,D		C>A,B,D		D>A				

Fonte: Adaptado de Wirth-Dzieciolowska et al, 2009.

A – Swiss webster

B – BALB/c

C- C57BL/6

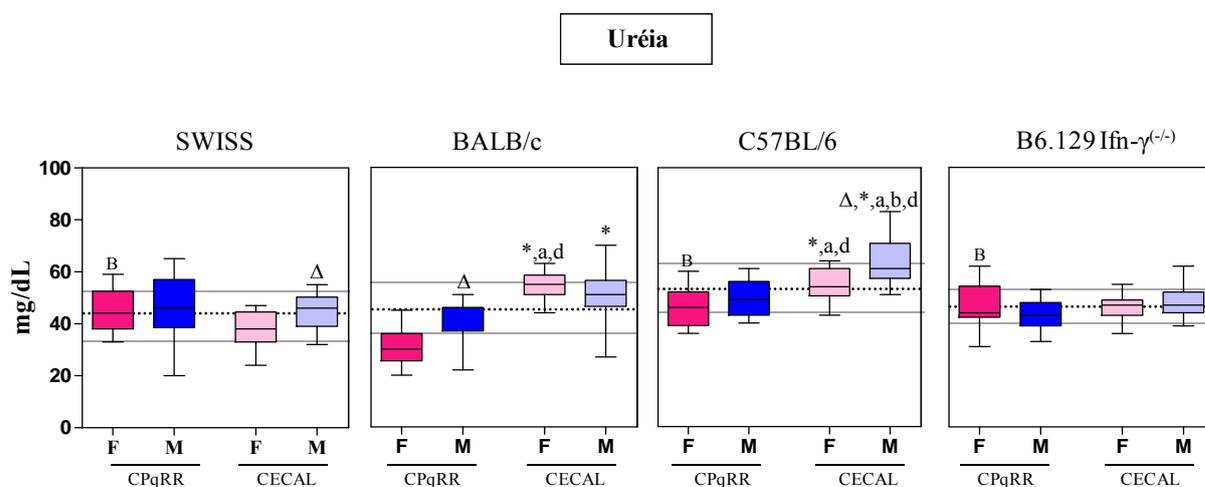
D - Ifn- $\gamma^{(-)}$

## 5.2 Determinação dos níveis séricos de parâmetros bioquímicos

A determinação dos níveis séricos de parâmetros bioquímicos foi realizada em amostras de sangue de camundongos fêmeas e machos das linhagens Swiss webster, BALB/c, C57BL/6 e Ifn- $\gamma^{(-)}$  provenientes do CPqRR e CECAL. Foram avaliados os perfis de URE, CRE, ALT/TGP, AST/TGO, FA e PT. É importante mencionar que as análises estatísticas foram realizadas entre os sexos em um mesmo biotério/linhagem, entre as linhagens em um mesmo sexo/biotério e entre animais do mesmo sexo/linhagem em biotérios distintos. Além disso, salienta-se que nas análises estatísticas o critério adotado na utilização da simbologia para demonstrar diferenças estatisticamente significativas foi a fixação do símbolo no maior valor da mediana.

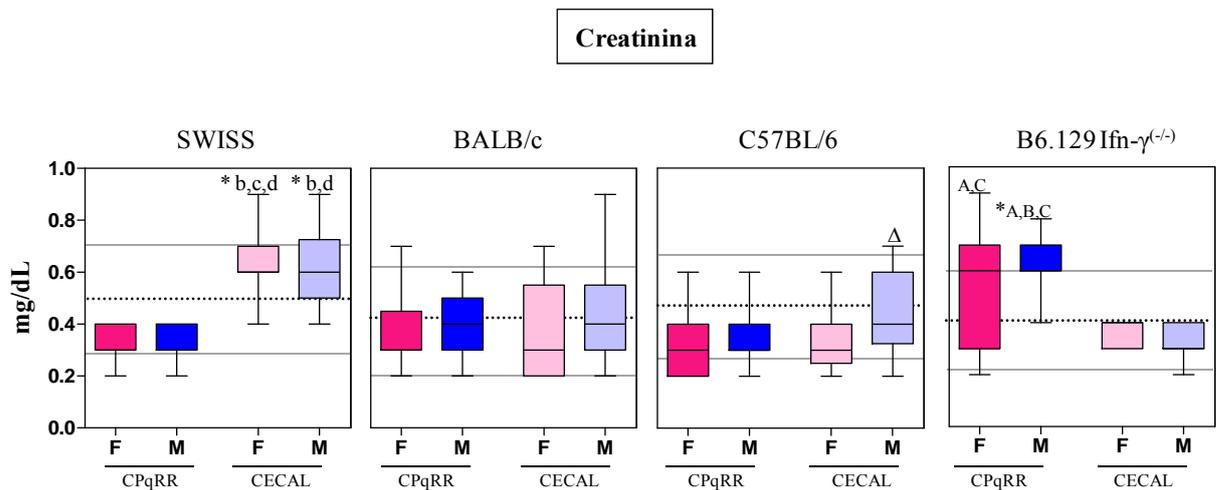
Com relação dos níveis séricos de uréia (**Figura 23**), comparando-se fêmeas e machos de uma mesma linhagem e biotério, foi observado que somente os machos da linhagem BALB/c provenientes do CPqRR apresentaram valores superiores aos das fêmeas. Contudo,

machos das linhagens Swiss webster e C57BL/6 provenientes do CECAL apresentaram valores superiores aos das fêmeas. Quando comparados animais do mesmo sexo e linhagem em biotérios distintos, tanto os machos quanto as fêmeas das linhagens BALB/c e C57BL/6 provenientes do CECAL apresentaram valores maiores que seus correspondentes no CPqRR. Quando comparadas diferentes linhagens provenientes do CPqRR, as fêmeas de Swiss webster, C57BL/6 e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  apresentaram valores superiores aos apresentados pelas fêmeas BALB/c. Nas linhagens provenientes do CECAL, as fêmeas de BALB/c e C57BL/6 apresentaram valores maiores que os das fêmeas de Swiss webster e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$ . Já os machos da linhagem C57BL/6 apresentaram valores superiores às outras três linhagens estudadas.



**Figura 23:** Determinação dos níveis séricos de uréia em camundongos fêmeas (F) e machos (M) das linhagens Swiss webster (F=22; M=22), BALB/c (F=21; M=21), C57BL/6 (F=21; M=21) e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  (F=19; M=19) provenientes do CPqRR e CECAL. Os resultados estão expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo das populações avaliadas. As linhas tracejadas pretas correspondem à média global da linhagem e as linhas contínuas cinzas aos seus respectivos desvios padrões. (Δ): Diferenças estatisticamente significativas entre animais de sexo distinto da mesma linhagem no CPqRR e CECAL ( $p < 0,05$ ). (\*): Diferenças estatisticamente significativas entre animais do mesmo sexo/linhagem em biotérios distintos ( $p < 0,05$ ). (A, B, C, D): Diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em um mesmo sexo no CPqRR ( $p < 0,05$ ). (a, b, c, d): Diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em um mesmo sexo no CECAL ( $p < 0,05$ ).

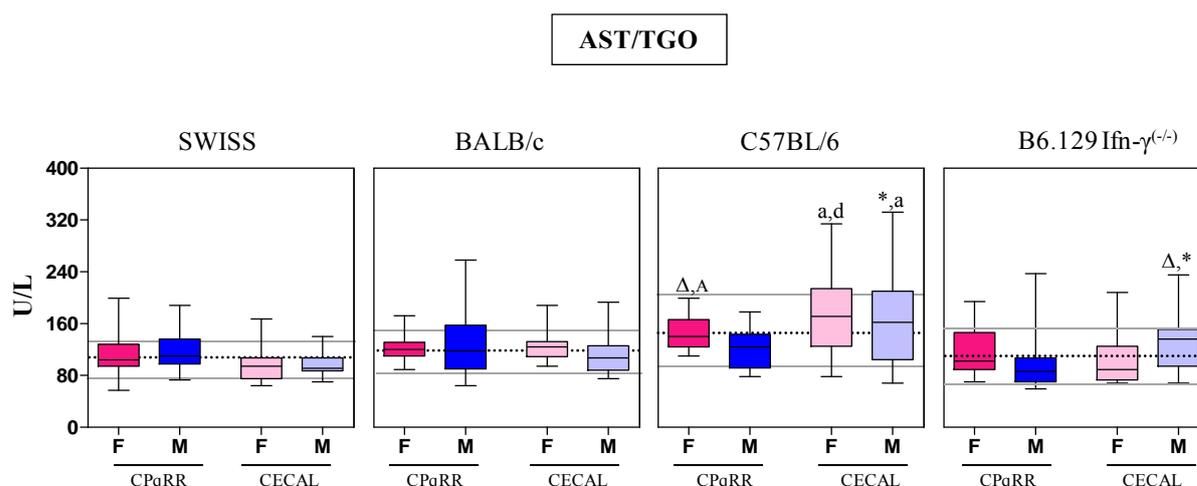
Com relação à análise dos níveis séricos de creatinina (**Figura 24**), comparando-se fêmeas e machos de uma mesma linhagem e biotério, foi observado que os machos da linhagem C57BL/6 provenientes do CECAL apresentaram valores superiores aos das fêmeas. Quando comparados animais do mesmo sexo e linhagem em biotérios distintos, os machos da linhagem  $\text{Ifn-}\gamma^{(-)}$  provenientes do CPqRR apresentaram valores superiores aos dos machos do CECAL. Já na linhagem Swiss webster, tanto os machos quanto as fêmeas do CECAL apresentaram valores maiores que seus correspondentes no CPqRR. Quando comparadas diferentes linhagens provenientes do CPqRR, as fêmeas da linhagem  $\text{Ifn-}\gamma^{(-)}$  apresentaram valores superiores às fêmeas de Swiss webster e C57BL/6, bem como os machos que também apresentaram valores maiores que as outras linhagens estudadas, inclusive BALB/c. Nas linhagens provenientes do CECAL, tanto as fêmeas quanto os machos de Swiss webster apresentaram valores maiores que as demais linhagens estudadas, sendo que entre os machos somente a linhagem C57BL/6 não apresentou diferença estatisticamente significativa.



**Figura 24:** Determinação dos níveis séricos de creatinina em camundongos fêmeas (F) e machos (M) das linhagens Swiss webster (F=22; M=22), BALB/c (F=21; M=21), C57BL/6 (F=21; M=21) e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  (F=19; M=19) provenientes do CPqRR e CECAL. Os resultados estão expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo das populações avaliadas. As linhas tracejadas pretas correspondem à média global da linhagem e as linhas contínuas cinzas aos seus respectivos desvios padrões. ( $\Delta$ ): Diferenças estatisticamente significativas entre animais de sexo distinto da mesma linhagem no CPqRR e CECAL ( $p < 0,05$ ). (\*): Diferenças estatisticamente significativas entre animais do mesmo sexo/linhagem em biotérios distintos ( $p < 0,05$ ). (A, B, C, D): Diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em um mesmo sexo no CPqRR ( $p < 0,05$ ). (a, b, c, d): Diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em um mesmo sexo no CECAL ( $p < 0,05$ ).

Com relação à análise dos níveis séricos de AST/TGO (**Figura 25**), comparando-se fêmeas e machos de uma mesma linhagem e biotério, foi observado que as fêmeas da linhagem C57BL/6 provenientes do CPqRR apresentaram valores superiores aos dos machos. Já no CECAL, os machos de  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  apresentaram valores superiores aos das fêmeas. Quando comparados animais do mesmo sexo e linhagem em biotérios distintos, os machos da linhagem C57BL/6 e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  provenientes do CECAL apresentaram valores maiores que seus correspondentes no CPqRR. Quando comparadas diferentes linhagens provenientes do CPqRR, as fêmeas da linhagem C57BL/6 apresentaram valores maiores que as fêmeas de Swiss webster. Nas linhagens provenientes do CECAL, as fêmeas de C57BL/6 apresentaram valores maiores que as fêmeas de Swiss webster e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  e os machos de desta mesma

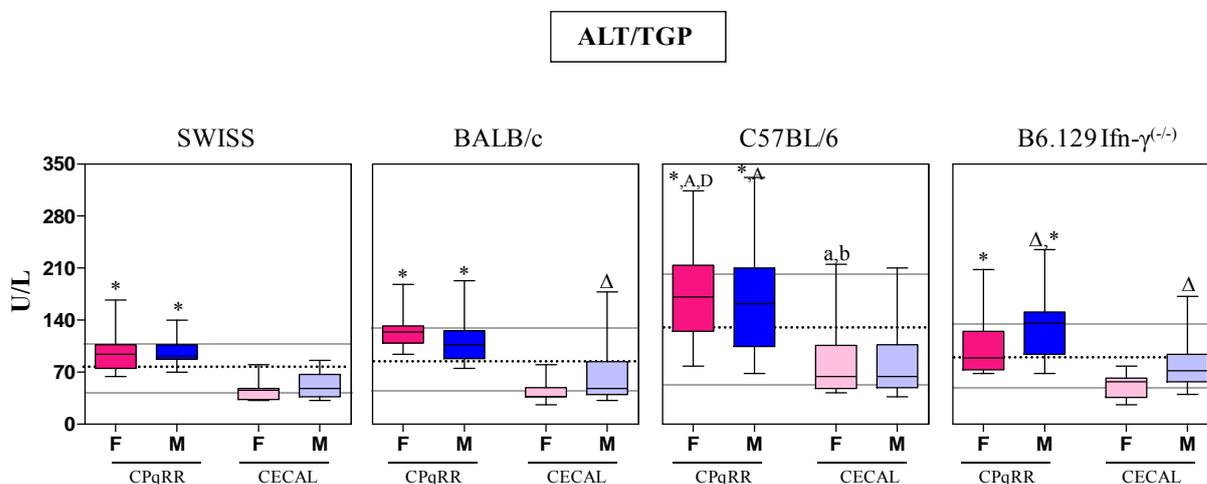
linhagem apresentaram valores maiores que os machos de Swiss webster.



**Figura 25:** Determinação dos níveis séricos de AST/TGO em camundongos fêmeas (F) e machos (M) das linhagens Swiss webster (F=22; M=22), BALB/c (F=21; M=21), C57BL/6 (F=21; M=21) e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  (F=19; M=19) provenientes do CPqRR e CECAL. Os resultados estão expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo das populações avaliadas. As linhas tracejadas pretas correspondem à média global da linhagem e as linhas contínuas cinzas aos seus respectivos desvios padrões. ( $\Delta$ ): Diferenças estatisticamente significativas entre animais de sexo distinto da mesma linhagem no CPqRR e CECAL ( $p < 0,05$ ). (\*): Diferenças estatisticamente significativas entre animais do mesmo sexo/linhagem em biotérios distintos ( $p < 0,05$ ). (A, B, C, D): Diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em um mesmo sexo no CPqRR ( $p < 0,05$ ). (a, b, c, d): Diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em um mesmo sexo no CECAL ( $p < 0,05$ ).

Com relação à análise dos níveis séricos de ALT/TGP (**Figura 26**), comparando-se fêmeas e machos de uma mesma linhagem e biotério, foi observado que somente os machos da linhagem  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  provenientes do CPqRR apresentaram valores superiores aos das fêmeas. Contudo, machos das linhagens BALB/c e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  provenientes do CECAL apresentaram valores superiores aos das fêmeas. Quando comparados animais do mesmo sexo e linhagem em biotérios distintos, tanto os machos quanto as fêmeas de todas as linhagens estudadas provenientes do CPqRR apresentaram valores maiores que seus correspondentes no CECAL. Quando comparadas diferentes linhagens provenientes do CPqRR, as fêmeas da linhagem

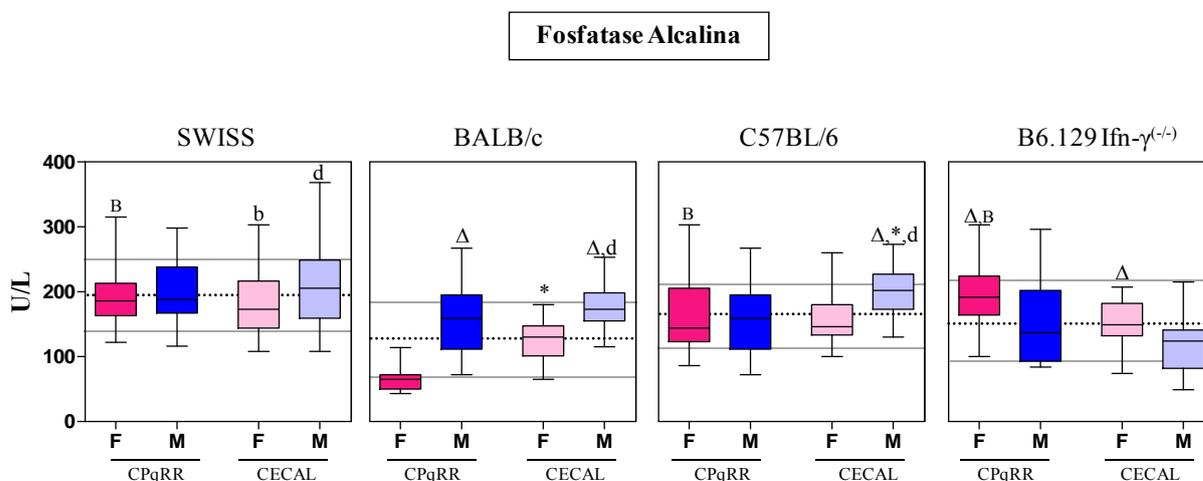
C57BL/6 apresentaram valores superiores aos apresentados pelas fêmeas de Swiss webster e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-)}$  e os machos de C57BL/6 apresentaram valores maiores que os apresentados pelos machos de Swiss webster. Nas linhagens provenientes do CECAL, as fêmeas de C57BL/6 apresentaram valores maiores que as fêmeas de Swiss webster e BALB/c.



**Figura 26:** Determinação dos níveis séricos de ALT/TGP em camundongos fêmeas (F) e machos (M) das linhagens Swiss webster (F=22; M=22), BALB/c (F=21; M=21), C57BL/6 (F=21; M=21) e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-)}$  (F=19; M=19) provenientes do CPqRR e CECAL. Os resultados estão expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo das populações avaliadas. As linhas tracejadas pretas correspondem à média global da linhagem e as linhas contínuas cinzas aos seus respectivos desvios padrões. ( $\Delta$ ): Diferenças estatisticamente significativas entre animais de sexo distinto da mesma linhagem no CPqRR e CECAL ( $p < 0,05$ ). (\*): Diferenças estatisticamente significativas entre animais do mesmo sexo/linhagem em biotérios distintos ( $p < 0,05$ ). (A, B, C, D): Diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em um mesmo sexo no CPqRR ( $p < 0,05$ ). (a, b, c, d): Diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em um mesmo sexo no CECAL ( $p < 0,05$ ).

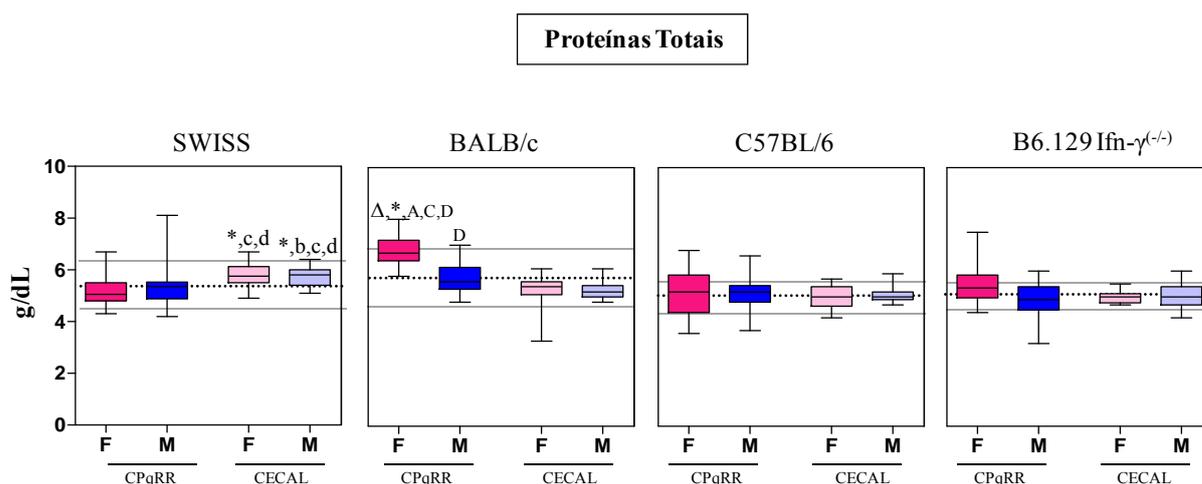
Com relação à análise dos níveis séricos de fosfatase alcalina (**Figura 27**), comparando-se fêmeas e machos de uma mesma linhagem e biotério, foi observado no CPqRR que os machos da linhagem BALB/c apresentaram valores superiores aos das fêmeas, enquanto que as fêmeas de  $\text{Ifn-}\gamma^{(-)}$  apresentaram valores superiores aos dos machos. Já no CECAL os machos das linhagens BALB/c e C57BL/6 apresentaram valores superiores aos

das fêmeas, enquanto que as fêmeas de  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  apresentaram valores superiores aos dos machos. Quando comparados animais do mesmo sexo e linhagem em biotérios distintos, as fêmeas da linhagem BALB/c e os machos da linhagem C57BL/6 provenientes do CECAL apresentaram valores maiores que seus correspondentes no CPqRR. Quando comparadas diferentes linhagens provenientes do CPqRR, as fêmeas de Swiss webster, C57BL/6 e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  apresentaram valores maiores que as fêmeas de BALB/c. Nas linhagens provenientes do CECAL, as fêmeas de Swiss webster apresentaram valores maiores que as fêmeas de BALB/c e os machos de Swiss webster, BALB/c e C57BL/6 apresentaram valores maiores que os machos de  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$ .



**Figura 27:** Determinação dos níveis séricos de fosfatase alcalina em camundongos fêmeas (F) e machos (M) das linhagens Swiss webster (F=22; M=22), BALB/c (F=21; M=21), C57BL/6 (F=21; M=21) e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  (F=19; M=19) provenientes do CPqRR e CECAL. Os resultados estão expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo das populações avaliadas. As linhas tracejadas pretas correspondem à média global da linhagem e as linhas contínuas cinzas aos seus respectivos desvios padrões. (Δ): Diferenças estatisticamente significativas entre animais de sexo distinto da mesma linhagem no CPqRR e CECAL ( $p < 0,05$ ). (\*): Diferenças estatisticamente significativas entre animais do mesmo sexo/linhagem em biotérios distintos ( $p < 0,05$ ). (A, B, C, D): Diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em um mesmo sexo no CPqRR ( $p < 0,05$ ). (a, b, c, d): Diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em um mesmo sexo no CECAL ( $p < 0,05$ ).

Com relação à análise dos níveis séricos de proteínas totais (**Figura 28**), comparando-se fêmeas e machos de uma mesma linhagem e biotério, foi observado que somente as fêmeas da linhagem BALB/c provenientes do CPqRR apresentaram valores superiores aos dos machos. Quando comparados animais do mesmo sexo e linhagem em biotérios distintos, as fêmeas da linhagem BALB/c provenientes do CPqRR apresentaram valores maiores que as fêmeas do CECAL, enquanto que as fêmeas e machos da linhagem Swiss webster provenientes do CECAL apresentaram valores maiores que seus correspondentes no CPqRR. Quando comparadas diferentes linhagens provenientes do CPqRR, as fêmeas da linhagem BALB/c apresentaram valores maiores que as fêmeas das demais linhagens estudadas e os machos desta mesma linhagem apresentaram valores maiores que os machos da linhagem  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$ . Nas linhagens provenientes do CECAL, as fêmeas de Swiss webster apresentaram valores maiores que as fêmeas de C57BL/6 e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  e os machos desta mesma linhagem apresentaram valores maiores que as outras três linhagens estudadas.



**Figura 28:** Determinação dos níveis séricos de proteínas totais em camundongos fêmeas (F) e machos (M) das linhagens Swiss webster (F=22; M=22), BALB/c (F=21; M=21), C57BL/6 (F=21; M=21) e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  (F=19; M=19) provenientes do CPqRR e CECAL. Os resultados estão expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo das populações avaliadas. As linhas tracejadas pretas correspondem à média global da linhagem e as linhas contínuas cinzas aos seus respectivos desvios padrões. ( $\Delta$ ): Diferenças estatisticamente significativas entre animais de sexo distinto da mesma linhagem no CPqRR e CECAL ( $p < 0,05$ ). (\*): Diferenças estatisticamente significativas entre animais do mesmo sexo/linhagem em biotérios distintos ( $p < 0,05$ ). (A, B,

C, D): Diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em um mesmo sexo no CPqRR ( $p < 0,05$ ). (a, b, c, d): Diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em um mesmo sexo no CECAL ( $p < 0,05$ ).

As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) encontradas na determinação dos níveis séricos de URE, CRE, AST/TGO, ALT/TGP, FA e PT referente às comparações realizadas entre animais de sexos distintos em uma mesma linhagem e biotério se encontram na **Tabela 13**.

**Tabela 13:** Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) encontradas na determinação dos níveis séricos de URE, CRE, AST/TGO, ALT/TGP, FA e PT quando comparados animais de sexos distintos em uma mesma linhagem e biotério

Linhagem/Biotério	Parâmetro					
	URE	CRE	AST/TGO	ALT/TGP	FA	PT
<b>CPqRR</b>						
Swiss webster					F < M	
BALB/c	F < M					F > M
C57BL/6			F > M	F < M	F > M	
Ifn- $\gamma^{(-/-)}$						
<b>CECAL</b>						
Swiss webster	F < M					
BALB/c				F < M	F < M	
C57BL/6	F < M	F < M		F < M	F < M	
Ifn- $\gamma^{(-/-)}$			F < M	F < M	F > M	

**Fonte:** Adaptado de Wirth-Dzieciolowska et al, 2009.  
F - fêmeas; M - machos.

As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) encontradas na determinação dos níveis séricos de URE, CRE, AST/TGO, ALT/TGP, FA e PT referente às comparações realizadas entre animais do mesmo sexo e linhagem em biotérios distintos se encontram na **Tabela 14**.

**Tabela 14:** Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) encontradas na determinação dos níveis séricos de URE, CRE, AST/TGO, ALT/TGP, FA e PT quando comparados animais do mesmo sexo e linhagem em biotérios distintos

Linhagem/Sexo	Parâmetro					
	URE	CRE	AST/TGO	ALT/TGP	FA	PT
Swiss webster F		R < C		R > C		R < C
M		R < C		R > C		R < C
BALB/c F	R < C			R > C	R < C	R > C
M	R < C			R > C		
C57BL/6 F	R < C			R > C		
M	R < C		R < C	R > C	R < C	
Ifn- $\gamma^{(-/-)}$ F				R > C		
M		R > C	R < C	R > C		

Fonte: Adaptado de Wirth-Dzieciolowska et al, 2009.

F - fêmeas; M - machos.

R - CPqRR

C - CECAL

As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) encontradas na determinação dos níveis séricos de URE, CRE, AST/TGO, ALT/TGP, FA e PT referente às comparações realizadas entre animais do mesmo sexo e biotério e linhagens distintas se encontram na **Tabela 15**.

**Tabela 15:** Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) encontradas na determinação dos níveis séricos de URE, CRE, AST/TGO, ALT/TGP, FA e PT quando comparados animais do mesmo sexo e biotério e linhagens distintas

Biotério/Sexo	Parâmetro					
	URE	CRE	AST/TGO	ALT/TGP	FA	PT
<b>CPqRR</b>						
Fêmea	A,C,D>B	A,B>D	A>C	A,D>C	A,C,D>B	A,C,D>B
Macho		A,B,C>D		A>C		B>D
<b>CECAL</b>						
Fêmea	A,D>B,C	A>B,C,D A>B,D	A,D>C	A,B>C	A>B	A>C,D
Macho	A,B,D>C		A>C		A,B,C>D	A>B,C,D

Fonte: Adaptado de Wirth-Dzieciolowska et al, 2009.

A - Swiss webster

B - BALB/c

C - C57BL/6

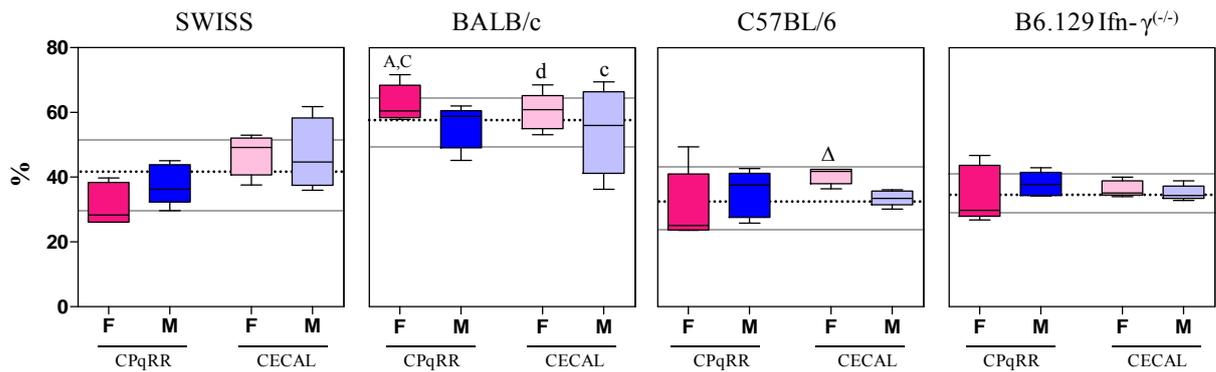
D - Ifn- $\gamma^{(-/-)}$

### 5.3 Avaliação do perfil de parâmetros imunológicos

A determinação do perfil de parâmetros imunológicos foi realizada em amostras de sangue de camundongos fêmeas e machos das linhagens Swiss webster, BALB/c, C57BL/6 e Ifn- $\gamma^{(-)}$  provenientes do CPqRR e CECAL. Foram avaliados os perfis de CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e CD19<sup>+</sup>. É importante mencionar que as análises estatísticas foram realizadas entre os sexos em um mesmo biotério/linhagem, entre as linhagens em um mesmo sexo/biotério e entre animais do mesmo sexo/linhagem em biotérios distintos. Além disso, salienta-se que nas análises estatísticas o critério adotado na utilização da simbologia para demonstrar diferenças estatisticamente significativas foi a fixação do símbolo no maior valor da mediana.

Com relação à análise do perfil de linfócitos T (CD3<sup>+</sup>) (**Figura 29**), comparando-se fêmeas e machos de uma mesma linhagem e biotério, foi observado que somente as fêmeas da linhagem C57BL/6 provenientes do CECAL apresentaram valores superiores aos dos machos. Quando comparados animais do mesmo sexo e linhagem em biotérios distintos, nenhuma linhagem apresentou diferença estatisticamente significativa. Quando comparadas diferentes linhagens provenientes do CPqRR, somente as fêmeas de BALB/c apresentaram valores superiores aos apresentados pelas fêmeas de Swiss webster e C57BL/6. Nas linhagens do CECAL, as fêmeas de BALB/c apresentaram valores superiores aos das fêmeas de Ifn- $\gamma^{(-)}$ , enquanto que os machos desta mesma linhagem apresentaram valores superiores aos dos machos de C57BL/6.

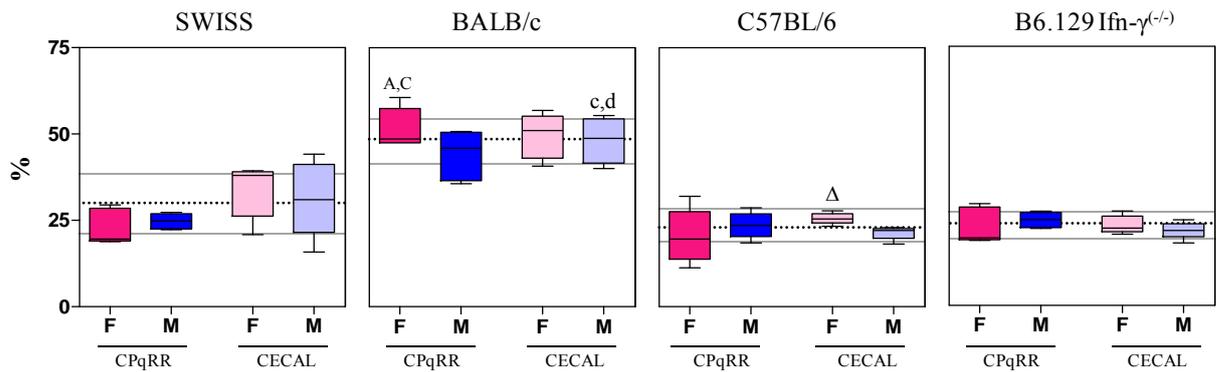
CD3<sup>+</sup>



**Figura 29:** Determinação do perfil de linfócitos T (CD3<sup>+</sup>) em camundongos fêmeas (F) e machos (M) das linhagens Swiss webster (F=5; M=5), BALB/c (F=5; M=5), C57BL/6 (F=5; M=5) e Ifn- $\gamma^{(-/-)}$  (F=5; M=5) provenientes do CPqRR e CECAL. Os resultados estão expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo das populações avaliadas. As linhas tracejadas pretas correspondem à média global da linhagem e as linhas contínuas cinzas aos seus respectivos desvios padrões. ( $\Delta$ ): Diferenças estatisticamente significativas entre animais de sexo distinto da mesma linhagem no CPqRR e CECAL ( $p < 0,05$ ). (\*): Diferenças estatisticamente significativas entre animais do mesmo sexo/linhagem em biotérios distintos ( $p < 0,05$ ). (A, B, C, D): Diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em um mesmo sexo no CPqRR ( $p < 0,05$ ). (a, b, c, d): Diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em um mesmo sexo no CECAL ( $p < 0,05$ ).

Com relação à análise do perfil de linfócitos T auxiliares (CD4<sup>+</sup>) (**Figura 30**), comparando-se fêmeas e machos de uma mesma linhagem e biotério, foi observado que somente as fêmeas da linhagem C57BL/6 provenientes do CECAL apresentaram valores superiores aos dos machos. Quando comparados animais do mesmo sexo e linhagem em biotérios distintos, nenhuma linhagem apresentou diferença estatisticamente significativa. Quando comparadas diferentes linhagens provenientes do CPqRR, somente as fêmeas de BALB/c apresentaram valores superiores aos apresentados pelas fêmeas de Swiss webster e C57BL/6. Nas linhagens do CECAL, os machos da linhagem BALB/c apresentaram valores superiores aos dos machos de C57BL/6 e Ifn- $\gamma^{(-/-)}$ .

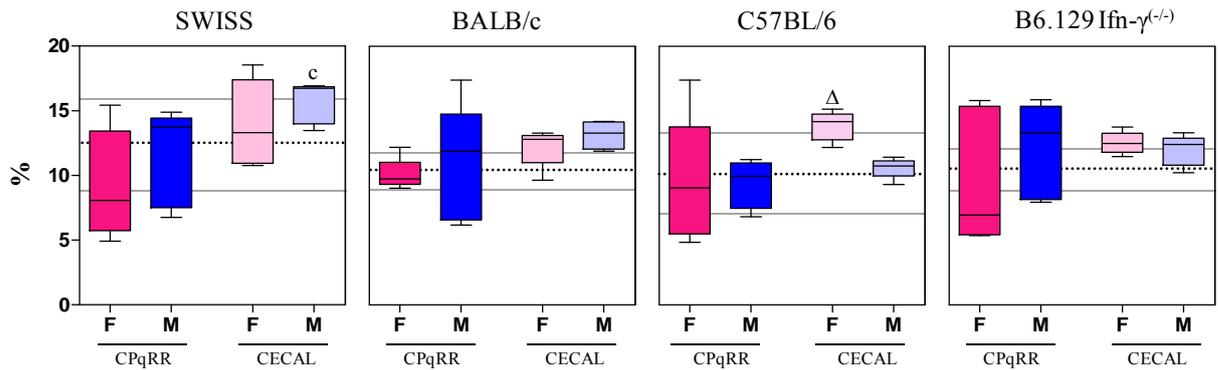
CD4<sup>+</sup>



**Figura 30:** Determinação do perfil de linfócitos T auxiliares (CD4<sup>+</sup>) em camundongos fêmeas (F) e machos (M) das linhagens Swiss webster (F=5; M=5), BALB/c (F=5; M=5), C57BL/6 (F=5; M=5) e Ifn- $\gamma^{(-/-)}$  (F=5; M=5) provenientes do CPqRR e CECAL. Os resultados estão expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo das populações avaliadas. As linhas tracejadas pretas correspondem à média global da linhagem e as linhas contínuas cinzas aos seus respectivos desvios padrões. ( $\Delta$ ): Diferenças estatisticamente significativas entre animais de sexo distinto da mesma linhagem no CPqRR e CECAL ( $p < 0,05$ ). (\*): Diferenças estatisticamente significativas entre animais do mesmo sexo/linhagem em biotérios distintos ( $p < 0,05$ ). (A, B, C, D): Diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em um mesmo sexo no CPqRR ( $p < 0,05$ ). (a, b, c, d): Diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em um mesmo sexo no CECAL ( $p < 0,05$ ).

Com relação à análise do perfil de linfócitos T citotóxicos/supressores (CD8<sup>+</sup>) (**Figura 31**), comparando-se fêmeas e machos de uma mesma linhagem e biotério, foi observado que somente as fêmeas da linhagem C57BL/6 provenientes do CECAL apresentaram valores superiores aos dos machos. Quando comparados animais do mesmo sexo e linhagem em biotérios distintos, não houve diferença estatisticamente significativa em nenhuma das linhagens estudadas. Quando comparadas diferentes linhagens provenientes do CECAL, somente os machos de Swiss webster apresentaram valores maiores que os apresentados pelos machos de C57BL/6.

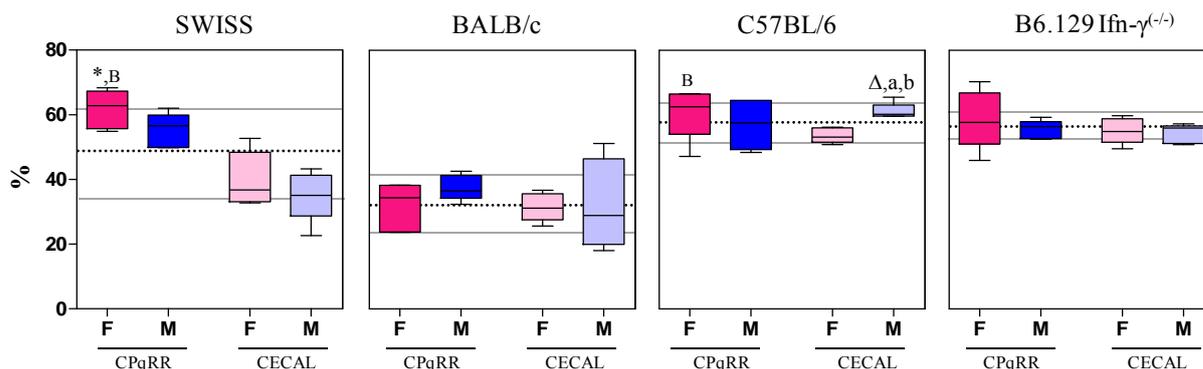
CD8<sup>+</sup>



**Figura 31:** Determinação do perfil de linfócitos T citotóxicos/supressores (CD8<sup>+</sup>) em camundongos fêmeas (F) e machos (M) das linhagens Swiss webster (F=5; M=5), BALB/c (F=5; M=5), C57BL/6 (F=5; M=5) e Ifn-γ<sup>(-/-)</sup> (F=5; M=5) provenientes do CPqRR e CECAL. Os resultados estão expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo das populações avaliadas. As linhas tracejadas pretas correspondem à média global da linhagem e as linhas contínuas cinzas aos seus respectivos desvios padrões. (Δ): Diferenças estatisticamente significativas entre animais de sexo distinto da mesma linhagem no CPqRR e CECAL (p<0,05). (\*): Diferenças estatisticamente significativas entre animais do mesmo sexo/linhagem em biotérios distintos (p<0,05). (A, B, C, D): Diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em um mesmo sexo no CPqRR (p<0,05). (a, b, c, d): Diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em um mesmo sexo no CECAL (p<0,05).

Com relação à análise do perfil de linfócitos B (CD19<sup>+</sup>) (**Figura 32**), comparando-se fêmeas e machos de uma mesma linhagem e biotério, foi observado que somente os machos da linhagem C57BL/6 provenientes do CECAL apresentaram valores superiores aos das fêmeas. Quando comparados animais do mesmo sexo e linhagem em biotérios distintos, as fêmeas da linhagem Swiss webster provenientes do CPqRR apresentaram valores superiores aos das fêmeas do CECAL. Quando comparadas diferentes linhagens provenientes do CPqRR, as fêmeas de Swiss webster e C57BL/6 apresentaram valores superiores aos apresentados pelas fêmeas de BALB/c. Nas linhagens do CECAL, os machos de C57BL/6 apresentaram valores superiores aos dos machos de Swiss webster e BALB/c.

CD19<sup>+</sup>



**Figura 32:** Determinação do perfil de linfócitos B (CD19<sup>+</sup>) em camundongos fêmeas (F) e machos (M) das linhagens Swiss webster (F=5; M=5), BALB/c (F=5; M=5), C57BL/6 (F=5; M=5) e Ifn- $\gamma$ <sup>(-/-)</sup> (F=5; M=5) provenientes do CPqRR e CECAL. Os resultados estão expressos em formato de gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo das populações avaliadas. As linhas tracejadas pretas correspondem à média global da linhagem e as linhas contínuas cinzas aos seus respectivos desvios padrões. ( $\Delta$ ): Diferenças estatisticamente significativas entre animais de sexo distinto da mesma linhagem no CPqRR e CECAL ( $p < 0,05$ ). (\*): Diferenças estatisticamente significativas entre animais do mesmo sexo/linhagem em biotérios distintos ( $p < 0,05$ ). (A, B, C, D): Diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em um mesmo sexo no CPqRR ( $p < 0,05$ ). (a, b, c, d): Diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em um mesmo sexo no CECAL ( $p < 0,05$ ).

As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) encontradas na determinação dos perfis de linfócitos T e de suas subpopulações CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e linfócitos B (CD19<sup>+</sup>) referente às comparações realizadas entre animais de sexos distintos em uma mesma linhagem e biotério se encontram na **Tabela 16**.

**Tabela 16:** Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) encontradas na determinação dos perfis de linfócitos T e de suas subpopulações  $CD4^+$  e  $CD8^+$  e linfócitos B ( $CD19^+$ ) quando comparados animais de sexos distintos em uma mesma linhagem e biotério

Linhagem/Biotério	Parâmetro			
	$CD3^+$	$CD4^+$	$CD8^+$	$CD19^+$
<b>CPqRR</b>				
Swiss webster				
BALB/c				
C57BL/6				
$I\text{fn-}\gamma^{(-/-)}$				
<b>CECAL</b>				
Swiss webster				
BALB/c				
C57BL/6	F > M	F > M	F > M	F < M
$I\text{fn-}\gamma^{(-/-)}$				

Fonte: Adaptado de Wirth-Dzieciolowska et al, 2009.

F - fêmeas; M - machos.

As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) encontradas na determinação dos perfis de linfócitos T e de suas subpopulações  $CD4^+$  e  $CD8^+$  e linfócitos B ( $CD19^+$ ) referente às comparações realizadas entre animais do mesmo sexo e linhagem em biotérios distintos se encontram na **Tabela 17**.

**Tabela 17:** Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) encontradas na determinação dos perfis de linfócitos T e de suas subpopulações  $CD4^+$  e  $CD8^+$  e linfócitos B ( $CD19^+$ ) quando comparados animais do mesmo sexo e linhagem em biotérios distintos

Linhagem/Sexo	Parâmetro			
	$CD3^+$	$CD4^+$	$CD8^+$	$CD19^+$
Swiss webster F				R > C
M				
BALB/c F				
M				
C57BL/6 F				
M				
$I\text{fn-}\gamma^{(-/-)}$ F				
M				

Fonte: Adaptado de Wirth-Dzieciolowska et al, 2009.

F - fêmeas; M - machos.

R - CPqRR

C - CECAL

As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) encontradas na determinação dos perfis de linfócitos T e de suas subpopulações  $CD4^+$  e  $CD8^+$  e linfócitos B ( $CD19^+$ )

referente às comparações realizadas entre animais do mesmo sexo e biotério e linhagens distintas se encontram na **Tabela 18**.

**Tabela 18:** Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) encontradas na determinação dos perfis de linfócitos T e de suas subpopulações  $CD4^+$  e  $CD8^+$  e linfócitos B ( $CD19^+$ ) quando comparados animais do mesmo sexo e biotério e linhagens distintas

Biotério/Sexo	Parâmetro			
	$CD3^+$	$CD4^+$	$CD8^+$	$CD19^+$
<b>CPqRR</b>				
Fêmea	A,C<B	A,C<B		A,C>B
Macho				
<b>CECAL</b>				
Fêmea	B>D	B>C,D	A>C	
Macho				A,B<C

Fonte: Adaptado de Wirth-Dzieciolowska et al, 2009.

A – Swiss webster

B – BALB/c

C- C57BL/6

D -  $Ifn-\gamma^{(-)}$

#### *5.4 Estabelecimento de valores de referência para parâmetros hematológicos e bioquímicos*

**Tabela 19:** Média, desvio - padrão e valores de referência de parâmetros da série vermelha e plaquetas de fêmeas e machos de linhagens de camundongos produzidas nos biotérios do CPqRR e CECAL

<b>Linhagem/Sexo</b>	<b>HGB (g/dL)</b>	<b>RBC (<math>10^6/\text{mm}^3</math>)</b>	<b>HCT (%)</b>	<b>Parâmetro VCM (<math>\text{fm}^3</math>)</b>	<b>HCM (pg)</b>	<b>CHCM (g/dL)</b>	<b>PLT (<math>10^3/\text{mm}^3</math>)</b>
<b>CPqRR</b>							
Swiss webster	14,0 ± 1,1	8,4 ± 0,9	42,2 ± 4,4	51,3 ± 1,3	16,8 ± 1,4	33,1 ± 1,8	814,5 ± 156,0
F	(11,8 – 16,5)	(7,2 – 10,3)	(35,4 – 51,2)	(49,0 – 53,0)	(13,6 – 18,6)	(30,4 – 36,4)	(491,0 – 1117,0)
M	13,6 ± 1,9	8,2 ± 0,8	39,9 ± 4,2	49,4 ± 2,1	16,6 ± 1,2	33,9 ± 1,6	911,8 ± 142,8
	(11,5 – 16,1)	(6,8 – 9,8)	(32,8 – 47,9)	(45,0 – 52,0)	(13,9 – 18,2)	(30,3 – 35,7)	(603,0 – 1144,0)
BALB/c	13,6 ± 1,6	9,3 ± 0,9	42,5 ± 5,4	45,8 ± 0,7	14,7 ± 0,5	32,1 ± 1,1	726,6 ± 132,9
F	(10,3 – 16,6)	(7,2 – 11,2)	(33,1 – 52,0)	(45,0 – 47,0)	(13,9 – 15,5)	(30,3 – 33,7)	(439,0 – 957,0)
M	13,9 ± 1,0	9,0 ± 0,9	42,3 ± 3,9	46,9 ± 0,8	15,5 ± 0,8	32,9 ± 1,3	899,4 ± 99,1
	(11,5 – 15,6)	(7,4 – 11,1)	(34,3 – 51,3)	(46,0 – 48,0)	(14,1 – 16,9)	(30,5 – 35,4)	(635,0 – 1118,0)
C57BL/6	12,1 ± 1,2	8,7 ± 0,9	39,2 ± 4,4	45,1 ± 1,4	14,0 ± 0,8	31,0 ± 1,5	910,1 ± 143,5
F	(9,2 – 13,5)	(7,1 – 9,8)	(30,5 – 45,5)	(43,0 – 48,0)	(13,0 – 15,9)	(29,1 – 34,9)	(519,0 – 1290,0)
M	11,9 ± 0,8	8,6 ± 0,7	38,4 ± 2,9	44,9 ± 0,9	13,8 ± 0,5	31,0 ± 1,1	1034 ± 143,5
	(10,6 – 13,5)	(7,3 – 9,8)	(32,5 – 43,3)	(43,0 – 46,0)	(12,8 – 14,7)	(29,2 – 33,3)	(666,0 – 1323,0)
Ifn- $\gamma^{(-)}$	12,6 ± 1,1	8,5 ± 0,8	40,1 ± 3,7	47,63 ± 1,5	14,9 ± 1,1	31,8 ± 2,1	697,6 ± 123,3
F	(10,8 – 15,3)	(7,1 – 10,1)	(32,9 – 46,4)	(45,0 – 50,0)	(12,5 – 16,5)	(28,9 – 35,8)	(486,0 – 904,0)
M	14,5 ± 2,0	9,4 ± 1,8	43,8 ± 6,4	46,68 ± 1,3	15,4 ± 0,5	33,1 ± 1,0	834,2 ± 152,5
	(12,0 – 18,5)	(5,9 – 12,6)	(34,5 – 56,8)	(45,0 – 50,0)	(14,2 – 16,1)	(30,3 – 34,9)	(459,0 – 1122,0)
<b>CECAL</b>							
Swiss webster	15,1 ± 1,1	8,3 ± 0,8	43,4 ± 3,8	52,3 ± 1,6	18,0 ± 0,9	34,6 ± 1,2	832,6 ± 107,1
F	(13,5 – 16,8)	(6,3 – 9,7)	(34,0 – 51,0)	(49,0 – 56,0)	(16,6 – 19,8)	(32,9 – 36,6)	(611,0 – 979,0)
M	14,1 ± 1,5	7,8 ± 1,0	40,6 ± 5,1	51,9 ± 1,4	18,0 ± 0,8	34,7 ± 1,3	889,3 ± 127,4
	(11,4 – 17,7)	(6,2 – 10,5)	(33,9 – 53,6)	(48,0 – 54,0)	(16,6 – 19,5)	(32,4 – 36,7)	(726,0 – 1204,0)
BALB/c	14,7 ± 1,4	8,5 ± 1,0	41,7 ± 5,0	48,9 ± 0,8	17,3 ± 1,0	35,4 ± 1,9	737,3 ± 167,7
F	(11,5 – 17,3)	(6,6 – 10,7)	(32,2 – 52,5)	(47,0 – 50,0)	(14,8 – 18,8)	(30,4 – 39,4)	(300,0 – 969,0)
M	13,9 ± 1,7	8,2 ± 1,1	42,2 ± 9,3	49,1 ± 1,0	17,0 ± 1,0	35,1 ± 1,3	723,8 ± 234,5
	(10,1 – 18,4)	(5,8 – 10,5)	(28,3 – 68,3)	(47,0 – 51,0)	(14,6 – 18,5)	(32,4 – 37,2)	(179,0 – 1025,0)
C57BL/6	14,5 ± 1,2	9,4 ± 0,8	45,3 ± 3,76	48,2 ± 0,8	15,4 ± 0,4	32,0 ± 0,6	705,8 ± 123,0
F	(12,0 – 16,7)	(7,7 – 11,0)	(37,2 – 52,4)	(47,0 – 49,0)	(14,7 – 16,1)	(31,0 – 33,5)	(464,0 – 891,0)
M	13,4 ± 1,2	8,4 ± 0,8	40,7 ± 3,9	48,3 ± 0,7	15,9 ± 0,4	32,9 ± 0,7	776,2 ± 101,1
	(10,5 – 15,2)	(6,4 – 9,8)	(30,4 – 46,6)	(46,0 – 49,0)	(15,0 – 16,7)	(31,7 – 34,6)	(472,0 – 920,0)
Ifn- $\gamma^{(-)}$	12,9 ± 1,5	8,5 ± 1,3	39,9 ± 5,9	47,3 ± 0,6	15,2 ± 0,4	32,3 ± 0,8	713,6 ± 76,1
F	(8,5 – 15,7)	(4,6 – 10,3)	(21,7 – 49,1)	(46,0 – 48,0)	(14,3 – 16,0)	(30,1 – 33,4)	(499,0 – 809,0)
M	11,5 ± 3,1	7,1 ± 2,1	34,2 ± 9,7	48,2 ± 1,6	16,3 ± 0,8	33,7 ± 1,0	835,7 ± 227,1
	(5,4 – 14,4)	(3,1 – 9,3)	(15,9 – 43,4)	(46,0 – 52,0)	(15,2 – 17,9)	(31,7 – 35,1)	(334,0 – 1182,0)

F - Fêmea, M – Macho

**Tabela 20:** Média, desvio - padrão e valores de referência de parâmetros da série branca de fêmeas e machos de linhagens de camundongos produzidas nos biotérios do CPqRR e CECAL

Linhagem/Sexo	Parâmetro								
	WBC ( $10^3/\text{mm}^3$ )	LINF (%)	LINF ( $\mu\text{L}$ )	NEUT (%)	NEUT ( $\mu\text{L}$ )	MONO (%)	MONO ( $\mu\text{L}$ )	EOSI (%)	EOSI ( $\mu\text{L}$ )
<b>CPqRR</b>									
Swiss webster	6,0 ± 1,8	91,7 ± 4,7	6145,0 ± 2593,0	7,8 ± 4,6	500,1 ± 296,7	0,1 ± 0,2	1,5 ± 7,2	0,4 ± 0,7	30,7 ± 67,7
F	(3,4 – 9,8)	(80,0 – 98,0)	(2924,0 – 13170,0)	(2,0 – 20,0)	(84,0 – 1332,0)	(0,0 – 1,0)	(0,0 – 34,0)	(0,0 – 2,0)	(0,0 – 296,0)
M	6,2 ± 2,4	84,8 ± 9,2	5344,0 ± 2418,0	12,3 ± 6,1	820,3 ± 593,9	0,2 ± 0,6	11,6 ± 34,8	0,6 ± 1,1	32,9 ± 58,0
	(3,0 – 11,2)	(62,0 – 98,0)	(2460,0 – 10980,0)	(2,0 – 24,0)	(213,0 – 2528,0)	(0,0 – 2,0)	(0,0 – 150,0)	(0,0 – 4,0)	(0,0 – 192,0)
BALB/c	2,9 ± 1,4	81,6 ± 8,4	2407,0 ± 1171,0	17,5 ± 7,3	512,8 ± 341,9	0,5 ± 0,9	9,1 ± 18,2	0,0	0,0
F	(1,0 – 5,5)	(63,0 – 94,0)	(760,0 – 5170,0)	(6,0 – 32,0)	(140,0 – 1376,0)	(0,0 – 2,0)	(0,0 – 58,0)		
M	3,6 ± 1,1	80,1 ± 9,2	2930,0 ± 992,0	16,9 ± 6,1	581,0 ± 238,8	1,3 ± 1,9	40,6 ± 55,2	0,4 ± 1,0	9,1 ± 24,7
	(2,0 – 5,9)	(56,0 – 92,0)	(1280,0 – 4956,0)	(8,0 – 32,0)	(288,0 – 1248,0)	(0,0 – 6,0)	(0,0 – 168,0)	(0,0 – 4,0)	(0,0 – 96,0)
C57BL/6	3,9 ± 1,0	85,4 ± 7,2	3354,0 ± 864,7	13,9 ± 7,1	583,8 ± 75,1	0,6 ± 0,9	29,6 ± 53,6	0,1 ± 0,5	5,1 ± 16,9
F	(1,9 – 5,6)	(72,0 – 98,0)	(1368,0 – 4704,0)	(2,0 – 28,0)	(72,0 – 1232,0)	(0,0 – 2,0)	(0,0 – 196,0)	(0,0 – 2,0)	(0,0 – 70,0)
M	3,7 ± 1,4	86,1 ± 5,3	3167,0 ± 1136,0	13,2 ± 5,3	509,3 ± 307,6	1,1 ± 1,6	37,4 ± 58,8	0,3 ± 0,7	10,7 ± 27,1
	(1,5 – 6,3)	(76,0 – 98,0)	(1290,0 – 5418,0)	(2,0 – 24,0)	(38,0 – 1134,0)	(0,0 – 4,0)	(0,0 – 192,0)	(0,0 – 2,0)	(0,0 – 90,0)
Ifn- $\gamma^{(-/-)}$	3,1 ± 1,4	85,7 ± 5,8	2970,0 ± 1350,0	13,8 ± 6,2	530,8 ± 489,6	0,2 ± 0,9	3,4 ± 14,7	0,1 ± 0,5	2,1 ± 9,2
F	(1,6 – 6,1)	(74,0 – 96,0)	(1440,0 – 5467,0)	(4,0 – 26,0)	(96,0 – 1768,0)	(0,0 – 0,4)	(0,0 – 64,0)	(0,0 – 2,0)	(0,0 – 40,0)
M	3,6 ± 1,3	85,2 ± 6,4	3227,0 ± 1243,0	14,6 ± 6,1	564,6 ± 350,6	0,2 ± 0,9	17,2 ± 75,3	0,3 ± 0,8	11,8 ± 28,1
	(1,8 – 6,3)	(72,0 – 96,0)	(1476,0 – 5544,0)	(4,0 – 26,0)	(128,0 – 1600,0)	(0,0 – 0,4)	(0,0 – 328,0)	(0,0 – 2,0)	(0,0 – 80,0)
<b>CECAL</b>									
Swiss webster	5,2 ± 2,0	88,6 ± 6,0	4604,0 ± 1769,0	11,4 ± 6,1	587,9 ± 361,2	0,0	0,0	0,2 ± 0,5	8,2 ± 22,6
F	(2,5 – 10,3)	(74,0 – 98,0)	(2400,0 – 9064,0)	(4,0 – 24,0)	(100,0 – 1290,0)			(0,0 – 2,0)	(0,0 – 76,0)
M	3,6 ± 1,3	86,9 ± 7,3	3140,0 ± 1239,0	13,8 ± 8,5	458,6 ± 231,5	0,2 ± 0,5	5,36 ± 14,2	0,2 ± 0,5	7,3 ± 20,7
	(1,3 – 6,2)	(74,0 – 98,0)	(1040,0 – 5684,0)	(2,0 – 36,0)	(22,0 – 885,0)	(0,0 – 2,0)	(0,0 – 48,0)	(0,0 – 2,0)	(0,0 – 84,0)
BALB/c	2,7 ± 0,7	85,8 ± 6,5	2396,0 ± 846,2	13,9 ± 6,5	409,4 ± 231,5	0,3 ± 0,7	7,2 ± 18,9	0,1 ± 0,2	1,2 ± 5,5
F	(1,1 – 4,0)	(62,0 – 98,0)	(1078,0 – 5015,0)	(2,0 – 26,0)	(22,0 – 885,0)	(0,0 – 2,0)	(0,0 – 64,0)	(0,0 – 1,0)	(0,0 – 25,0)
M	2,7 ± 0,8	83,1 ± 9,5	2185,0 ± 635,0	16,5 ± 9,3	492,3 ± 318,6	0,3 ± 1,0	11,0 ± 37,4	0,1 ± 0,4	2,1 ± 9,6
	(1,6 – 4,1)	(62,0 – 98,0)	(1050,0 – 3360,0)	(2,0 – 36,0)	(34,0 – 1050,0)	(0,0 – 4,0)	(0,0 – 160,0)	(0,0 – 2,0)	(0,0 – 44,0)
C57BL/6	4,5 ± 1,4	85,1 ± 6,0	3821,0 ± 1262,0	14,6 ± 6,1	638,9 ± 291,9	0,3 ± 0,7	16,6 ± 35,8	0,0	0,0
F	(2,8 – 7,5)	(70,0 – 94,0)	(2378,0 – 6600,0)	(6,0 – 30,0)	(192,0 – 1326,0)	(0,0 – 2,0)	(0,0 – 144,0)		
M	5,7 ± 1,8	85,6 ± 6,6	4905,0 ± 1638,0	14,2 ± 6,6	802,0 ± 398,1	0,0	0,0	0,2 ± 0,5	12,1 ± 39,0
	(2,4 – 9,2)	(66,0 – 93,0)	(1980,0 – 8464,0)	(7,0 – 34,0)	(240,0 – 1740,0)			(0,0 – 2,0)	(0,0 – 174,0)
Ifn- $\gamma^{(-/-)}$	3,3 ± 0,9	90,6 ± 5,7	3031,0 ± 908,0	9,3 ± 5,7	292,8 ± 181,7	0,0	0,0	0,0	0,0
F	(2,1 – 5,2)	(76,0 – 98,0)	(1722,0 – 4628,0)	(2,0 – 24,0)	(86,0 – 792,0)				
M	5,6 ± 1,8	79,6 ± 10,3	4447,0 ± 1529,0	19,3 ± 10,5	956,8 ± 491,0	0,6 ± 1,1	37,1 ± 86,8	0,3 ± 0,7	15,5 ± 31,2
	(2,5 – 9,1)	(60,0 – 90,0)	(2125,0 – 7830,0)	(8,0 – 40,0)	(352,0 – 2000,0)	(0,0 – 4,0)	(0,0 – 364,0)	(0,0 – 2,0)	(0,0 – 82,0)

F - Fêmea, M - Macho

**Tabela 21:** Média, desvio - padrão e valores de referência de parâmetros bioquímicos de fêmeas e machos de linhagens de camundongos produzidas nos biotérios do CPqRR e CECAL

Linhagem/Sexo	Parâmetro					
	URE (mg/dL)	CRE (mg/dL)	AST/TGO (U/L)	ALT/TGP (U/L)	FA (U/L)	PT (g/dL)
<b>CPqRR</b>						
Swiss webster	44,9 ± 7,8	0,3 ± 0,1	112,9 ± 31,5	95,4 ± 25,1	195,1 ± 53,3	5,2 ± 0,6
F	(33,0 – 59,0)	(0,2 – 0,4)	(57,0 – 199,0)	(64,0 – 167,0)	(122,0 – 315,0)	(4,3 – 6,7)
M	46,7 ± 12,2	0,3 ± 0,1	118,7 ± 30,1	97,3 ± 18,5	202,0 ± 56,4	5,4 ± 0,8
	(20,0 – 65,0)	(0,2 – 0,4)	(73,0 – 188,0)	(70,0 – 140,0)	(116,0 – 298,0)	(4,2 – 8,1)
BALB/c	31,2 ± 7,2	0,4 ± 0,1	122,1 ± 20,0	126,2 ± 25,8	65,6 ± 18,1	6,9 ± 0,5
F	(20,0 – 45,0)	(0,2 – 0,7)	(89,0 – 172,0)	(94,0 – 188,0)	(43,0 – 114,0)	(5,8 – 8,0)
M	41,5 ± 8,6	0,1 ± 0,1	125,6 ± 47,1	110,8 ± 30,5	154,1 ± 53,4	5,8 ± 0,6
	(22,0 – 51,0)	(0,2 – 0,6)	(64,0 – 258,0)	(75,0 – 193,0)	(72,0 – 267,0)	(4,8 – 7,0)
C57BL/6	46,0 ± 7,0	0,3 ± 0,1	143,8 ± 25,9	174,7 ± 62,2	161,8 ± 54,6	5,2 ± 1,0
F	(36,0 – 60,0)	(0,2 – 0,6)	(110,0 – 199,0)	(78,0 – 314,0)	(86,0 – 303,0)	(3,6 – 6,8)
M	49,8 ± 6,7	0,3 ± 0,1	117,1 ± 29,5	174,1 ± 78,8	154,1 ± 53,4	5,1 ± 0,6
	(40,0 – 61,0)	(0,2 – 0,6)	(78,0 – 178,0)	(68,0 – 332,0)	(72,0 – 267,0)	(3,7 – 6,6)
Ifn- $\gamma^{(-/-)}$	46,6 ± 7,9	0,5 ± 0,2	116,7 ± 36,9	99,6 ± 35,9	195,1 ± 51,2	5,4 ± 0,7
F	(31,0 – 62,0)	(0,2 – 0,9)	(70,0 – 194,0)	(68,0 – 208,0)	(100,0 – 303,0)	(4,4 – 7,5)
M	43,4 ± 5,6	0,6 ± 0,1	101,2 ± 47,0	135,2 ± 49,4	154,2 ± 62,0	5,0 ± 0,7
	(33,0 – 53,0)	(0,4 – 0,8)	(59,0 – 237,0)	(68,0 – 235,0)	(84,0 – 296,0)	(3,2 – 6,0)
<b>CECAL</b>						
Swiss webster	38,1 ± 6,8	0,6 ± 0,1	95,4 ± 25,1	46,2 ± 14,3	183,8 ± 54,2	5,8 ± 0,4
F	(24,0 – 47,0)	(0,4 – 0,9)	(64,0 – 167,0)	(32,0 – 80,0)	(108,0 – 303,0)	(4,9 – 6,7)
M	44,4 ± 6,6	0,6 ± 0,1	97,3 ± 18,5	51,4 ± 15,4	211,6 ± 63,3	5,8 ± 0,4
	(32,0 – 55,0)	(0,4 – 0,9)	(70,0 – 140,0)	(32,0 – 86,0)	(108,0 – 368,0)	(5,1 – 6,4)
BALB/c	54,6 ± 5,0	0,4 ± 0,2	126,2 ± 25,8	43,8 ± 13,1	123,5 ± 30,1	5,3 ± 0,6
F	(44,0 – 63,0)	(0,2 – 0,7)	(94,0 – 188,0)	(26,0 – 80,0)	(65,0 – 180,0)	(3,3 – 6,1)
M	51,3 ± 9,0	0,4 ± 0,2	110,8 ± 30,5	63,4 ± 40,7	177,1 ± 33,5	5,3 ± 0,3
	(27,0 – 70,0)	(0,2 – 0,9)	(75,0 – 193,0)	(32,0 – 178,0)	(115,0 – 253,0)	(4,8 – 6,1)
C57BL/6	55,0 ± 6,7	0,4 ± 0,1	174,7 ± 62,2	81,3 ± 43,3	161,6 ± 37,8	5,0 ± 0,4
F	(43,0 – 64,0)	(0,2 – 0,6)	(78,0 – 314,0)	(42,0 – 215,0)	(100,0 – 260,0)	(4,2 – 5,7)
M	63,6 ± 9,0	0,5 ± 0,2	174,1 ± 78,8	86,0 ± 51,1	199,9 ± 37,3	5,1 ± 0,3
	(51,0 – 83,0)	(0,2 – 0,7)	(68,0 – 332,0)	(37,0 – 210,0)	(130,0 – 273,0)	(4,7 – 5,9)
Ifn- $\gamma^{(-/-)}$	45,7 ± 5,0	0,4 ± 0,1	100,0 ± 35,9	51,7 ± 15,4	155,4 ± 39,0	5,0 ± 0,2
F	(36,0 – 55,0)	(0,3 – 0,4)	(68,0 – 208,0)	(26,0 – 78,0)	(74,0 – 207,0)	(4,7 – 5,5)
M	48,8 ± 6,1	0,3 ± 0,1	135,2 ± 49,4	82,0 ± 37,1	120,8 ± 45,3	5,1 ± 0,4
	(39,0 – 62,0)	(0,2 – 0,4)	(68,9 – 235,0)	(40,0 – 172,0)	(49,0 – 215,0)	(4,2 – 6,0)

F - Fêmea, M - Macho

## **6 DISCUSSÃO**

Um dos fatores mais críticos em patologia clínica é a utilização de valores de referência já estabelecidos para uma determinada população na interpretação dos resultados obtidos a partir de um indivíduo que não pertence a este grupo. A população de referência a ser utilizada na determinação dos valores é raramente ou insuficientemente descrita, sendo inviável sua representatividade na avaliação dos indivíduos testados (Lefebvre, 2011). Algumas variáveis devem ser consideradas tais como, idade, sexo, ciclo estral, genótipo, entre outros (Almeida et al, 2008). Portanto, torna-se essencial a utilização de valores de referência específicos no monitoramento das condições de saúde, variações biológicas, efeitos de drogas e alterações do sistema endócrino (Koga et al, 2005), uma vez que a exata caracterização dos traços fenotípicos em animais de laboratório é de extrema relevância para a seleção de linhagens de camundongos apropriadas para várias análises *in vivo* e para identificação de modificações mais precisas com relação aos controles (Mazzacara et al, 2008).

Os parâmetros hematológicos, bioquímicos e imunológicos são amplamente utilizados como indicadores do comportamento fisiológico do animal em resposta a alterações endógenas e também como biomarcadores de diagnósticos. As alterações destes parâmetros podem sugerir lesões em órgãos ou tecidos e ainda auxiliar no sistema de criação das espécies, pois estas modificações podem indicar infestações e/ou infecções ou ainda alterações no ambiente (Shahsavani, 2010). A determinação destes valores, quando corretamente interpretados, pode demonstrar precisamente as condições do animal no momento da amostragem (padrão nutricional, condição de doenças, estresse devido ao cativeiro ou manejo), bem como a qualidade do seu habitat (Pérez et al, 2003).

Assim, os animais utilizados em experimentação devem possuir um padrão adequado de qualidade, sendo criados ou mantidos em condições que minimizem a ocorrência de enfermidades, garantam seu padrão genético e reduzam as variações ambientais e nutricionais.

Neste contexto, este trabalho caracterizou parâmetros hematológicos e bioquímicos, além de avaliar o perfil imunológico de quatro linhagens de camundongos produzidas nos biotérios do CPqRR e CECAL. Estudos prévios demonstraram existir variação tanto entre as linhagens de camundongos quanto entre suas idades e sexo no que diz respeito à hematologia, bioquímica e imunologia (Peters et al, 2002; Champy et al, 2008; Petkova et al, 2008). O estudo de parâmetros hematológicos, bioquímicos e imunológicos em diferentes linhagens de camundongos foi previamente descrito por outros autores (Frith et al, 1980; Almeida et al, 2008; Barrios et al, 2009) que reportaram que a análise destes resultados é dependente da idade, sexo e contribuição genética. Além disso, o local de coleta do sangue e a metodologia

utilizada para a realização das análises devem ser mantidos durante todo o experimento, pois assim como em outras espécies as contagens dos parâmetros hematológicos são menores em veias centrais e no sangue do coração quando comparadas com locais mais periféricos (Nemzek et al, 2001; Schnell et al, 2002). Desta forma, em nosso estudo foi utilizada a técnica de punção cardíaca como método de escolha para a coleta de sangue.

Com relação à comparação entre os sexos, nas análises hematológicas em geral, apesar dos animais exibirem dimorfismo sexual na maioria dos parâmetros pesquisados, as diferenças foram pequenas, embora consideradas estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) (**Tabela 7**). As fêmeas do CECAL apresentaram de uma forma geral valores maiores que os machos para a maioria dos parâmetros analisados da série vermelha do sangue, corroborando dados disponíveis na literatura (Kile et al, 2003; Schnell et al, 2002; Wirth-Dzieciolowska et al, 2009), especialmente na linhagem C57BL/6. Neste biotério, a avaliação da concentração de HGB mostrou ser maior nas fêmeas de Swiss webster, BALB/c e C57BL/6. Em estudo realizado por Zhou & Hansson, (2004), foi verificado que as fêmeas de BALB/c e C57BL/6 também possuem valores maiores que os dos machos para este parâmetro. Em machos de BALB/c do CECAL quando comparados com as fêmeas desta mesma linhagem, apesar da diferença não ter sido estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), foi observado um desvio muito elevado ( $SD \pm 9,73$ ) para HCT, podendo ter como possível causa a desidratação inaparente de alguns animais como demonstrado por Rebar, 1993. Ao contrário do que foi visto por Svenson et al, (2006), na análise dos índices hematimétricos, somente para o VCM as fêmeas do CPqRR apresentaram valores maiores que os dos machos, enquanto que os percentuais de HCM e CHCM apresentaram uma tendência oposta, com os valores dos machos maiores que os das fêmeas em ambos os biotérios.

Já na série branca do sangue (**Tabela 8**), Schnell et al, (2002), Wirth-Dzieciolowska et al, (2009) e Mazzaccara et al, (2008) destacaram que nas contagens de WBC total e diferencial, os machos geralmente apresentam valores superiores aos das fêmeas e nossos resultados também demonstraram esta tendência. De acordo com Kile et al, (2003), uma maior contagem de WBC em machos pode ser atribuída ao fato de existirem brigas e consequentemente estresse entre os animais deste sexo mantidos em uma mesma gaiola durante o desmame, o que faz com que esta população se eleve. Em nosso trabalho, no que diz respeito à contagem absoluta de neutrófilos e seu percentual em animais das linhagens Swiss webster provenientes do CPqRR e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  do CECAL, podemos perceber que os machos apresentaram valores bem distintos aos das fêmeas e, além disso, com um valor

máximo muito elevado que, conseqüentemente, fez com que os valores de WBC se mostrassem aumentados. Segundo Chen et al, (2011) a elevação da contagem desta população de leucócitos está diretamente associada a infecções de origem bacteriana. Segundo a FELASA (2002), a introdução de agentes indesejáveis nas colônias de roedores é devido principalmente a fatores relacionados à entrada de novos animais sem a realização de quarentena, bem como de materiais biológicos, defeitos em equipamentos e ao não cumprimento dos procedimentos operacionais padronizados pelo corpo técnico. Como pode ser visto no **Anexo 8.1**, no monitoramento sanitário dos animais do CPqRR foram detectadas quatro espécies de bactérias, *Citrobacter rodentium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycoplasma pulmonis* e *Streptococcus pneumoniae* que podem justificar a elevação da população de neutrófilos. No que diz respeito aos animais do CECAL, podemos verificar no **Anexo 8.2** que no último monitoramento, realizado no mês de maio, antes do envio para o CPqRR foram identificadas quatro espécies de bactérias na amostragem, *Pasteurella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Citrobacter rodentium* e *Pseudomonas* spp. Este fato pode estar associado ao contato deste lote de animais com patógenos bacterianos em decorrência de uma provável falha nas barreiras de contenção existentes. Ainda de acordo com a FELASA, (2002) a colônia de animais é considerada positiva até que o organismo identificado tenha sido erradicado por rederivação ou pela recolonização com animais provenientes de outras fontes sabidamente SPF. O patógeno somente poderá ser considerado erradicado se os resultados do monitoramento demonstrarem-se negativos durante 18 meses após o último resultado positivo para o agente. Com relação aos basófilos, Dvorak (2000) publicou que esta população é rara no sangue e também pouco diferenciada entre os granulócitos. Portanto, é importante salientar que em nosso estudo foi verificada a ausência destas células e que este fato também foi evidenciado por Kile et al, (2003).

Assim, como em outros estudos (Kile et al, 2003; Schnell et al, 2002), o número de plaquetas também foi maior nos machos e no presente trabalho verificou-se uma diferença estatisticamente significativa nas linhagens BALB/c do CPqRR e C57BL/6 e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  de ambos os biotérios. No entanto, as maiores diferenças entre as médias de fêmeas e machos ocorreram em  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$ , com valores de F: 697,6 e M: 834,2 x 10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup> no CPqRR e F: 713,6 e M: 835,7 x 10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup> no CECAL. Segundo os mesmos autores, a contagem de plaquetas varia consideravelmente no que diz respeito ao sexo dos animais.

Na análise dos parâmetros bioquímicos (**Tabela 9**) associados às funções renais, em todas as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ), os machos apresentaram valores

superiores aos das fêmeas. Vale ressaltar que no perfil de URE os valores mínimo, 25%, 50% - mediana, 75% e máximo das fêmeas de BALB/c provenientes do CPqRR ficaram abaixo do desvio quando comparadas com os machos. Ainda assim, os valores de referência de ambos os sexos foram semelhantes (F: 20-45 e M: 22-51 mg/dL), embora diferenças estatisticamente significativas tenham sido encontradas. Da mesma forma, nos parâmetros associados às funções hepáticas, a maioria dos machos também apresentou valores superiores aos das fêmeas. Nossos dados corroboram com o estudo realizado por Champy et al, (2008) no que diz respeito aos parâmetros URE e CRE, mas demonstrou uma tendência oposta com relação aos outros parâmetros. Assim como no estudo realizado por Serfilippi et al, (2003), nossos resultados demonstraram que os parâmetros CRE e PT possuem menor variabilidade e desvios padrões entre os sexos e linhagens, enquanto que os parâmetros URE, AST/TGO, ALT/TGP e FA possuem uma tendência contrária, possivelmente por características próprias do analito, além daquelas inerentes à metodologia utilizada.

As diferenças entre os sexos podem influenciar nos processos relacionados à patogênese de lesões celulares devido a diversos agentes, tais como drogas, toxinas e infecções por vírus e, neste contexto, foi demonstrada a participação do estrógeno em diversos aspectos deste fenômeno (Hemieda et al, 2007). Segundo Schnell et al, (2002), as diferenças encontradas entre os sexos são provavelmente devido aos efeitos dependentes da coleta, além daqueles provenientes das diferenças fisiológicas. Geralmente o peso das fêmeas é menor que o dos machos e conseqüentemente, o volume de sangue disponível é inferior. Por este motivo, a coleta de um volume de amostra adequada é relativamente mais difícil em fêmeas que em machos. Desta forma, ocorre uma elevação de artefatos na amostra devido aos danos causados às células do sangue, além da contaminação do mesmo por fluidos abdominais principalmente nas fêmeas.

Com relação ao perfil imunológico, as células apresentadoras de antígenos reconhecem especificamente um antígeno estranho e respondem a este estímulo por meio da interação com linfócitos T e B (Alamooti et al, 2010). Para a análise das subpopulações de linfócitos, os resultados foram calculados como percentuais, levando-se em consideração a população de linfócitos totais. Em nosso estudo, nas análises imunofenóticas, não houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) para a maioria dos dados avaliados (**Tabela 10**). Na determinação de  $CD3^+$ ,  $CD4^+$  e  $CD8^+$ , as fêmeas de C57BL/6 provenientes do CECAL apresentaram valores superiores aos dos machos, enquanto que os machos desta mesma linhagem apresentaram valores de  $CD19^+$  maiores que os das fêmeas. Em estudo

realizado por Petkova et al, (2008) em sangue periférico de 30 linhagens com 6 meses de idade, foram encontradas diferenças significativas em somente duas linhagens no que diz respeito aos linfócitos T, mas em 22 linhagens os machos apresentaram valores estatisticamente maiores de células B que os das fêmeas. Apesar de não termos constatado diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em fêmeas e machos de todas as linhagens do CPqRR é possível perceber uma grande variação no percentual de  $CD8^+$ , especialmente em C57BL/6. Desta forma, enfatizamos que no monitoramento sanitário dos animais do CPqRR foi evidenciado o oxiurídeo *Syphacia* spp. e segundo Borkow et al, (2000) as infecções helmínticas causam uma ativação persistente do sistema imune que leva a uma desregulação das subpopulações linfocitárias, com diminuição de  $CD4^+$  e aumento de  $CD8^+$ . Fato semelhante ocorreu nos machos de BALB/c do CECAL. Nossos dados demonstraram existir uma grande homogeneidade entre os sexos no que diz respeito às subpopulações de linfócitos.

As diferenças encontradas entre os sexos geralmente se justificam por questões hormonais das fêmeas. Zhou & Hansson, (2004) propõem que o sexo desempenha um papel de mediador das reações imunes e da progressão das doenças. Eles explicam que pelo efeito do estrógeno na resposta celular imune, devido à adição de  $17\beta$ -estradiol, uma proliferação de células T é induzida em resposta à concentração de lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (LDL) nas células do baço de fêmeas jovens de camundongos deficientes em apoE. Borkow et al, (2000) afirmam ainda que as razões relacionadas ao dimorfismo sexual no sistema imune são complexas e envolvem tanto a programação de seu desenvolvimento quanto os efeitos diretos de esteróides sexuais em células maduras do sistema imunológico.

A comparação entre animais do mesmo sexo e linhagem em biotérios distintos teve como objetivo identificar a interferência de patógenos nos valores dos parâmetros estudados. É importante salientar que na literatura, as informações que dizem respeito a este tipo de comparação são escassas e por isso, encontramos dificuldade na comparação dos resultados obtidos. Previamente ao início dos experimentos, foi realizado o monitoramento sanitário dos animais do CPqRR e do CECAL. Foram detectados nos animais do CPqRR o Vírus da Encefalomielite Murina (Theiler), Vírus da Hepatite Murina (MHV), Vírus Diminuto de Camundongos (MMV), *Citrobacter rodentium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycoplasma pulmonis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Syphacia* spp., Tricomonídeos e *Giardia muris*. Já nos animais provenientes do CECAL foram encontradas as quatro espécies de bactérias mencionadas anteriormente. Chamamos a atenção para a presença de *Syphacia* spp. no CPqRR,

demonstrando assim, a alta prevalência deste parasito em colônias mantidas sob condições convencionais, ainda que dotados de barreiras sanitárias (Bazzano et al, 2002). Isto se justifica pela duração do ciclo de vida deste nematódeo, que é curta nesta espécie, induzindo a infecção em um grande número de camundongos em curtos períodos de tempo (Flynn, 1973, Jacoby & Fox, 1984, Scott & Gibbs, 1986, Coghlan et al, 1993, Moulia et al, 1993, Klement et al, 1996, Zenner, 1998). Desta forma, foi possível atestar a interferência de vírus e parasitos nos parâmetros estudados dos animais provenientes do CPqRR, uma vez que agentes bacterianos foram encontrados no CECAL.

Grande parte das patologias de origem infecciosa que acometem animais de laboratório é assintomática, entretanto, o sistema imune do animal quando ativado pode provocar aceleração funcional ou supressão. Quando ocorrem sinais clínicos e lesões não específicas de doenças infecciosas, pode-se associar a causa a processos de nutrição, estresse, desidratação, variações do ambiente, entre outros.

Com relação às análises hematológicas, na série vermelha do sangue, para a maioria dos parâmetros, fêmeas e machos provenientes do CECAL apresentaram valores superiores aos dos seus correspondentes no CPqRR (**Tabela 11**). Destacamos que os machos do CECAL em todas as linhagens foram maiores nos parâmetros VCM e HCM. Em contrapartida, os machos de  $\text{Ifn-}\gamma^{(-)}$  do CPqRR apresentaram valores maiores para HGB, RBC e HCT, quando comparados com o CECAL. Apesar das fêmeas de  $\text{Ifn-}\gamma^{(-)}$  não terem apresentado diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), seus resultados foram muito semelhantes aos dos machos. A diminuição dos valores destes parâmetros pode ser atribuída à hemorragia, hemólise ou diminuição da produção de eritrócitos (Car & Eng, 2001). Mas, por se tratar de uma tendência identificada nesta linhagem, acreditamos que apesar de os animais possuírem uma mesma origem e pertencerem a uma mesma linhagem, eles são provenientes de colônias de fundações diferentes em que já foram acasaladas mais de 20 gerações consecutivas e desta forma, podemos separá-las em sub-linhagens distintas com características hematopoiéticas próprias.

A determinação da série branca demonstrou que somente os machos apresentaram diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os biotérios (**Tabela 12**). Ao contrário do que era esperado, machos das linhagens C57BL/6 e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-)}$  provenientes do CECAL apresentaram valores maiores para WBC e linfócitos em nosso estudo. Nossa hipótese é de que, o biotério do CPqRR, mesmo se tratando de um padrão convencional controlado, onde existe uma certa prevalência de infecções, no momento da amostragem

tinham-nas controladas. Contudo, nos animais do CECAL, as infecções detectadas se encontravam em um processo agudo, mesmo não havendo diferença estatística na população de neutrófilos. Em linfócitos, as fêmeas e os machos de Swiss webster do CPqRR apresentaram valores superiores aos dos seus correspondentes no CECAL, embora somente nos machos os resultados tenham sido estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ). Estes resultados podem demonstrar uma incidência de infecção mais acentuada nos animais desta linhagem proveniente do CPqRR. Apesar da maioria das análises realizadas na população de monócitos não apresentarem diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ), podemos perceber um maior percentual de células deste parâmetro nas linhagens BALB/c e C57BL/6 do CPqRR, podendo indicar um possível processo de inflamação com o consequente aumento de macrófagos para os tecidos (Petkova et al, 2008). A determinação plaquetária mostrou que os machos das linhagens BALB/c e as fêmeas e machos de C57BL/6 provenientes do CPqRR apresentaram valores maiores que os de seus correspondentes no CECAL. Algumas fêmeas e machos da linhagem BALB/c do CECAL apresentaram valores muito baixos para este parâmetro, o que nos leva a suspeitar de um processo de diminuição da produção ou aumento da destruição desta série nestes animais (Repossini et al, 2012).

Com relação à caracterização dos níveis séricos de parâmetros bioquímicos, as fêmeas e os machos apresentaram diferenças estatísticas semelhantes entre os biotérios (**Tabela 13**). Apesar dos animais provenientes do CPqRR apresentarem valores mais baixos para URE, chamou-nos a atenção o fato de que os valores mínimo, 25%, 50% - mediana e 75% de fêmeas e machos de BALB/c estarem abaixo da média global e em contrapartida, fêmeas e machos desta mesma linhagem do CECAL apresentaram estes mesmo valores acima da média global. Situação oposta ocorreu na determinação dos níveis séricos de CRE, onde machos de  $\text{Ifn-}\gamma^{(-)}$  também provenientes do CPqRR apresentaram os valores mínimo, 25%, 50% - mediana, 75% e máximo acima do desvio, porém com intervalo semelhante ao da fêmea (F: 0,2-0,9 e M: 0,4-0,8 mg/dL). O aumento de CRE pode ser devido à hemoconcentração no momento da coleta do sangue (Zhou & Hansson, 2004), o que faz com que a contagem de RBC se eleve e, como podemos perceber, nesta linhagem a contagem deste parâmetro também foi mais alta que seu correspondente no CECAL. Além disso, na linhagem Swiss webster, as fêmeas e machos do CPqRR apresentaram todos os seus valores abaixo da mediana, enquanto que seus correspondentes no CECAL apresentaram a maioria dos valores acima da mediana. Os resultados para esta linhagem nos mostram a influência do sistema de criação e manutenção dos animais, no que diz respeito à variabilidade dos parâmetros.

Na caracterização das enzimas hepáticas (**Tabela 13**), somente os machos das linhagens C57BL/6 e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  do CECAL apresentaram valores superiores aos das fêmeas para AST/TGO. Destacamos a grande diferença dos valores de referência para esta linhagem em fêmeas e machos do CPqRR e CECAL respectivamente (F: 110-199 e M: 78-178; F: 78-314 e M: 68-332 U/L). Por se tratar de uma transaminase inespecífica para identificar lesões hepáticas e por termos constatado um grande intervalo de referência em ambos os sexos de animais provenientes do CECAL, podemos suspeitar da interferência dos patógenos encontrados neste biotério no perfil sérico deste parâmetro. Em ALT/TGP, fêmeas e machos de todas as linhagens provenientes do CPqRR apresentaram valores superiores aos dos seus correspondentes no CECAL. Com estes resultados, levantamos a hipótese de que o Vírus Diminuto de Camundongos (MMV) possa estar interferindo neste parâmetro, por meio de lesões causadas no fígado, que é um dos órgãos alvo da infecção. Os valores de referência para fêmeas e machos de C57BL/6 do CPqRR (F: 78-314 e M: 68-332 U/L) e CECAL (F: 100-260 e M: 130-273 U/L) apresentaram uma tendência contrária ao ocorrido na análise de AST/TGO, com valores bastante distintos no CPqRR. As fêmeas de BALB/c e os machos de C57BL/6 provenientes do CECAL apresentaram valores maiores que os de seus correspondentes no CPqRR para FA. Podemos perceber que a maioria das fêmeas de BALB/c do CPqRR apresentaram valores abaixo do desvio e este fato pode sinalizar um processo de desnutrição ou diminuição da atividade óssea nestes animais (Klein et al, 1993).

Na dosagem de PT podemos verificar que as fêmeas e os machos da linhagem Swiss webster provenientes do CECAL e fêmeas de BALB/c do CPqRR apresentaram valores estatisticamente maiores ( $p < 0,05$ ) que seus correspondentes (**Tabela 13**). É importante salientar sobre a homogeneidade dos animais para este parâmetro, que pode ser justificada pela metodologia empregada de reação de ponto final, que é mais estável, porém menos precisa, enquanto que para os outros analitos foi utilizada a metodologia de reação cinética. Ainda assim, podemos identificar em machos de Swiss webster e fêmeas de  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  do CPqRR e fêmeas de BALB/c do CECAL, desvios maiores. Segundo Beetham & Cattel, (1993), a elevação da concentração de PT pode ser devido a diversos fatores, dentre eles, a desidratação e a elevação de imunoglobulinas. Já a diminuição deste parâmetro pode ser explicada pela intoxicação hídrica, perda renal de proteínas, entre outros. Além disso, a determinação das subfrações protéicas albumina e globulinas também pode ser utilizada como uma ferramenta complementar na busca pelo diagnóstico (Schnell et al, 2002).

Na avaliação do perfil imunofenotípico, não houve diferença estatisticamente

significativa ( $p < 0,05$ ) para a maioria dos parâmetros analisados (**Tabela 14**). Somente as fêmeas de Swiss webster provenientes do CPqRR apresentaram valores superiores aos das fêmeas do CECAL na determinação do percentual de CD19<sup>+</sup>. Estes resultados demonstram mais uma vez a homogeneidade relacionada às subpopulações de linfócitos. Enfatizamos que na análise destes parâmetros foram utilizados cinco animais de cada sexo e linhagem e desta forma, o pequeno número de diferenças significativas encontradas neste estudo relacionadas à imunofenotipagem pode estar associado ao tamanho amostral. Contudo, em estudo realizado por Petkova et al, (2008), somente as diferenças entre as linhagens foram estatisticamente significativas quando comparados oito animais por sexo em 30 linhagens.

A influência genética no fenótipo do animal revela variações linhagem - específica na determinação de parâmetros sanguíneos. As linhagens heterogênicas são amplamente utilizadas em estudos envolvendo toxicidade, enquanto que as isogênicas são rotineiramente empregadas na avaliação de processos biológicos e patológicos (Petkova et al, 2008). Além disso, a interação entre genótipo e ambiente é reconhecida como uma importante fonte de variações experimentais quando características complexas são mensuradas em camundongos, embora a magnitude desta interação não seja avaliada (Valdar et al, 2006). Desta forma, a comparação entre diferentes linhagens do mesmo sexo e biotério teve como objetivo avaliar a influência do *background* genético do animal nos parâmetros avaliados. A análise dos nossos resultados revelou que um alto número de diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) foram encontradas na mensuração desta comparação.

Com relação à hematologia (**Tabela 15**), nas séries vermelha, branca e plaquetária em geral, os animais da linhagem Swiss webster apresentaram médias superiores aos das outras linhagens estudadas, evidenciando assim, a interferência da variabilidade genética nas características fenotípicas. Na caracterização da série vermelha, a média da concentração de HGB foi bastante semelhante entre todas as linhagens, porém, as fêmeas e os machos de C57BL/6 do CPqRR e fêmeas de *Ifn- $\gamma$ <sup>(-/-)</sup>* do CECAL exibiram os menores valores para este parâmetro. Nas determinações de RBC e HCT, somente as fêmeas de C57BL/6 provenientes do CECAL apresentaram valores superiores aos das fêmeas de Swiss webster e *Ifn- $\gamma$ <sup>(-/-)</sup>* respectivamente. De acordo com Frith et al, (1980) e Kile et al, (2003) as menores flutuações de valores hematológicos são vistas na avaliação dos índices hematimétricos e, ao contrário do que foi visto por estes autores, nosso estudo demonstrou diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre as linhagens, principalmente em Swiss webster do CPqRR e CECAL que apresentaram valores superiores aos da maioria das linhagens estudadas. Embora

as maiores diferenças tenham ocorrido na linhagem Swiss webster, podemos observar que  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  apresentou os maiores valores de referência e as menores contagens para todos os parâmetros desta série quando comparada com as outras três linhagens.

Com relação à análise da série branca (**Tabela 16**), as fêmeas de Swiss webster provenientes de ambos os biotérios apresentaram valores maiores que os das fêmeas de BALB/c e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  para WBC. Já entre os machos, não houve uma tendência, sendo que os machos de Swiss webster do CPqRR apresentaram valores estatisticamente maiores ( $p < 0,05$ ) que os machos de BALB/c e C57BL/6, assim como os machos de C57BL/6 e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  do CECAL com relação aos machos das linhagens Swiss webster e BALB/c. Assim como observado por Kile et al, (2003) e Wirth-Dziedziolowska et al, (2009), nossos resultados apresentaram uma grande variação na contagem de WBC, particularmente em Swiss webster, embora tenha nos chamado a atenção as baixas contagens deste parâmetro em BALB/c para ambos os biotérios, contudo com pouca significância estatística. De alguma forma, este fato pode representar a modificação de alguma característica genética fixada na sub-linhagem BALB/c originária do CECAL, de onde provém as matrizes do CPqRR. Na contagem percentual de linfócitos podemos destacar amplos valores de referência para todas as linhagens. Já na análise absoluta de linfócitos, as maiores diferenças e valores de referência foram observados em Swiss webster. Assim como em WBC, animais da linhagem BALB/c em geral, também apresentaram contagens absolutas e percentuais mais baixas para linfócitos. Uma tendência contrária ocorreu em BALB/c na caracterização do percentual de neutrófilos, que obteve as maiores médias, embora estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) somente quando comparada com fêmeas de Swiss webster do CPqRR. Estes resultados podem refletir uma maior susceptibilidade desta linhagem às infecções de origem bacteriana, uma vez que em ambos os biotérios foi detectada este tipo de infecção. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) nas contagens absolutas e percentuais de monócitos e eosinófilos.

Kile et al, (2003); Petters et al, (2002) e Wirth-Dziedziolowska et al, (2009) encontraram uma grande variação na contagem automatizada da série plaquetária entre as linhagens estudadas. Contudo, uma tendência oposta foi observada neste trabalho em que poucas diferenças foram encontradas nesta série. No CPqRR, somente as fêmeas de Swiss webster apresentaram valores maiores que as fêmeas de  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$ , enquanto que no CECAL as fêmeas de C57BL/6 apresentaram valores maiores que as fêmeas de BALB/c e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$ . Segundo Wirth-Dziedziolowska et al, (2009) as diferenças encontradas entre as linhagens

podem ser resultantes do background genético e de mutações que podem ocorrer em genes responsáveis pela hematopoiese.

Quando comparamos o perfil bioquímico das linhagens (**Tabela 17**) foi possível observar que as fêmeas e os machos de BALB/c do CPqRR apresentaram valores menores de URE que as outras linhagens (F: 31,24 e M: 41,52 mg/dL), porém a diferença foi estatisticamente significativa somente nas fêmeas. Em contrapartida, no CECAL ocorreu o inverso, BALB/c e C57BL/6 apresentaram respectivamente valores estatisticamente maiores (F: 54,57 e M: 51,33; F: 54,95 e M: 63,55 mg/dL) quando comparados com Swiss webster e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  (F: 38,14 e M: 44,36; F: 45,68 e M: 48,84 mg/dL). Nos machos deste biotério, animais da linhagem C57BL/6 apresentaram valores superiores aos das outras linhagens estudadas. Com relação à dosagem de CRE, fêmeas e machos de  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  do CPqRR apresentam valores maiores que as outras linhagens em geral, bem como fêmeas e machos de Swiss webster do CECAL com relação às outras linhagens. Apesar das variações inter-linhagens, vale ressaltar que as médias e os desvios mostraram-se semelhantes para este parâmetro.

Nos perfis séricos de AST/TGO e ALT/TGP (**Tabela 17**), a linhagem C57BL/6 proveniente do CPqRR e CECAL apresentaram medianas maiores quando comparadas com as outras linhagens, sobretudo com Swiss webster. O aumento das medianas foi acompanhado pelo aumento da média, desvios – padrões e valores de referência, podendo ser uma característica da linhagem no que diz respeito às transaminases. Na dosagem de FA os menores valores foram verificados na linhagem BALB/c, com exceção dos machos de  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$  do CECAL. Já na dosagem de PT, os maiores valores no CPqRR foram apresentados por fêmeas e machos de BALB/c, enquanto que no CECAL, por fêmeas e machos de Swiss webster. Podemos evidenciar neste parâmetro uma grande similaridade entre as linhagens com relação às médias e desvios, principalmente entre C57BL/6 e  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$ , demonstrando mais uma vez a influência do *background* C57BL/6 em  $\text{Ifn-}\gamma^{(-/-)}$ .

Frith et al, (1980) demonstraram em seu estudo que de uma forma geral, a linhagem BALB/c apresentou valores superiores aos de C57BL/6 na determinação de parâmetros hematológicos e bioquímicos, e em contrapartida, nossos resultados apresentaram uma tendência oposta. Contudo, em estudo realizado por Kile et al, (2003) e Barrios et al, (2009) em parâmetros hematológicos destas linhagens, a linhagem C57BL/6 também apresentou valores maiores que BALB/c.

Na avaliação imunofenotípica (**Tabela 18**), os perfis de  $\text{CD3}^+$  e  $\text{CD4}^+$  mostraram-se

bastante semelhantes, com predominância de valores maiores para fêmeas e machos da linhagem BALB/c de ambos os biotérios. No perfil de CD8<sup>+</sup>, somente os machos do CECAL da linhagem Swiss webster apresentaram valores superiores aos dos machos de C57BL/6. Como era previsto, para a subpopulação de linfócitos CD19<sup>+</sup>, animais da linhagem BALB/c apresentaram os menores valores quando comparados com as outras linhagens, sendo estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) com relação às fêmeas de Swiss webster e C57BL/6 do CPqRR e no CECAL, com machos de de C57BL/6. De uma forma geral, podemos notar uma similaridade no comportamento entre as linhagens de mesma origem (Swiss webster, BALB/c e C57BL/6 CPqRR e CECAL) e até mesmo nas sub-linhagens (Ifn- $\gamma^{(-)}$  CPqRR e CECAL). É possível perceber também que os animais da linhagem Ifn- $\gamma^{(-)}$  seguiram uma tendência semelhante aos animais C57BL/6 na maioria dos parâmetros estudados, ficando clara a interferência do *background* C57BL/6 nesta linhagem.

## **7 CONCLUSÃO**

A avaliação dos parâmetros hematológicos, bioquímicos e imunológicos em camundongos é de grande importância para uma correta interpretação dos dados experimentais. Nossas análises demonstraram diferenças nas respostas fisiológicas dos animais de acordo com o sexo, linhagem, idade e biotério de origem que podem gerar resultados controversos nos diversos ensaios. Desta forma, o presente estudo proporcionou importantes informações acerca das variações nos parâmetros avaliados fortalecendo assim, a necessidade do estabelecimento de valores de referência para cada biotério / instituição devido às grandes diferenças encontradas em animais com diferentes padrões sanitários. Além disso, auxiliou na investigação do estado de saúde dos animais e no entendimento de sua fisiologia. Portanto, este trabalho estabeleceu os valores de referência para parâmetros hematológicos e bioquímicos e avaliou o perfil imunológico de linhagens de camundongos consideradas saudáveis dentro dos padrões sanitários dos biotérios estudados. Neste contexto, as condições de saúde e bem-estar dos animais poderão ser atestadas e permitirão a obtenção de resultados científicos mais consistentes e confiáveis. Por fim, a caracterização desses parâmetros também auxiliará na promoção do sucesso da criação destes animais em cativeiro, uma vez que contribuirá para a implantação dos controles hematológico e bioquímico como atividade de rotina do Biotério do CPqRR, atendendo a uma demanda institucional já existente.

## **8 ANEXOS**

## ***8.1 Monitoramento sanitário dos animais do biotério do CPqRR***

















## ***8.2 Monitoramento sanitário dos animais do CECAL***











***8.3 Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz  
(CEUA / FIOCRUZ)***







#### ***8.4 Aprovação do Comitê Interno de Biossegurança do CPqRR***



## **9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Aasland KE, Skjerve E, Smith AJ. Quality of blood from the saphenous vein compared with the tail vein during multiple blood sampling in mice. *Lab Anim.* 2010; 44: 25-9.

Abbas AB, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 6ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.

Alamooti AA, Ardalan FA, Abdolahi A, Zeidi M, Firouzjaie F. Determination of Lymphocyte Subsets Reference Values in Healthy Iranian Men by a Single Platform Flow Cytometric Method. *Cytometry A*. 2010 Sep; 77(9): 890-4. PubMed PMID: 20803737. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cyto.a.20912/pdf>. Acesso em: 06 jun. 2011.

Almeida AS, Faleiros ACG, Teixeira DNS, Cota UA, Chica JEL. Reference values for blood-based biochemical parameters in BALB/c and C57BL/6 wild-type mice. *J Bras Patol Med Lab.* 2008; 44(6): 429-432.

American College of Laboratory Animal Medicine (ACLAM). Position statement on animal experimentation [internet]. Illinois: United States; 2004 [acesso em dez 2011]. Disponível em: [http://www.aclam.org/PDF/pub\\_animal\\_experimentation.pdf](http://www.aclam.org/PDF/pub_animal_experimentation.pdf).

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

Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS (Orgs.). *Animais de Laboratório: Criação e Experimentação*. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 2002.

Andriolo, A. *Medicina laboratorial*. 2ª Ed. São Paulo: Manole; 2008.

Bain BJ. *Blood cells: a practical guide*. 4ª ed. Oxford, UK: Blackwell; 2006.

Baker DG. Natural pathogens of laboratory mice, rats and rabbits and their effects on research. *Clin Microbiol Vet.* 1998; 11:231-266.

Barrios M, Rodríguez-Acosta A, Gil A, Salazar AM, Taylor P, Sánchez EE, et al. Comparative hemostatic parameters in BALB/c, C57BL/6 and C3H/He mice. *Thromb Res.* 2009 Jul; 124(3):338-43.

Bazzano T, Restel TI, Pinto RM, Gomes DC. Patterns of infection with the nematodes *Syphacia obvelata* and *Aspicularis tetraptera* in conventionally maintained laboratory mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002; 97: 847-853.

Beetham R, Cattel, WR. Proteinuria: pathophysiology, significance and recommendations for measurement in clinical practice. *Ann. Clin. Biochem.* 1993; 30: 425-434.

Bergonso, THD. Valores bioquímicos referenciais de javali (*Sus scrofa scrofa*, Linnaeus, 1758), confinados em fazendas do estado de São Paulo [dissertação]. São Paulo: Universidade Estadual Paulista; 2007.

Bhagwant S, Johri GN. A study on the less of immune response and haematological changes in aged mice experimentally infected with dwarf tapeworm *Hymenolepis nana*. *Indian J Exp Bio.* 1986; 24: 315-18.

Bhatt PN, Jacoby RO, Morse III HC, New AE (Eds). *Viral and mycoplasmal infections of laboratory rodents: effect on biomedical research.* New York: Academic Press; 1986.

Bland JM, Altman DG. Comparing methods of measurement: why plotting difference against standard method is misleading. *Lancet* 1995 Oct; 346(8982): 1085-7.

Bland JM, Altman DG. Measuring agreement in method comparison studies. *Stat Methods Med Res* 1999 Jun; 8(2):135-160.

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; PMID 15867408. Disponível em:  
<http://www.jwildlifedis.org/content/36/2/294.long>. Acesso em: 03 mar. 2011.

Borkow G, Leng Q, Weisman Z, Stein M, Galai N, Kalinkovich A, et al. Chronic immune activation associated with intestinal helminth infections results in impaired signal transduction and anergy. *J Clin Invest*. 2000 Oct; 106(8): 1053-1060.

Botting JH, Morrison AR. Animal research is vital to Medicine. *Scientific AM*. 1997 Feb; 67-9.

Brandt CT, Leite CRC, Manhães-de-Castro R, Brandt Filho C, Castro CMMB. Aderência e atividade microbicida de monócitos em portadores de esquistossomose mansônica cirúrgica. *Acta Cir Bras*. 2003 Mar-Abr; 18(2): 143-153.

Brockus CW, Mahaffey EA, Bush SE, Krupp-Despain W. Hematologic and serum biochemical reference intervals for Vietnamese potbellied pigs (*Sus scrofa*). *Comp Clin Path*. 2005; 13: 162-5.

Bugarski D, Jovicic G, Katic-Radivojevic S, Petakov M, Krstic A, Stojanovic N, et al. Hematopoietic changes and altered reactivity to IL-17 in *Syphacia obvelata* infected mice. *Parasitol Int*. 2005; 76: 403-9.

Buret A, Gal DG, Olson ME. Effects of immune giardiasis on growth, intestinal morphology and disaccharidase activity. *J Parasitol*. 1990; 76: 403-9.

Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE (Eds). *Tietz Fundamentos de Química Clínica*. 6<sup>a</sup> Ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.

Car BD, Eng VM. Special considerations in the evaluation of the hematology and hemostasis of mutant mice. *Vet Pathol*. 2001 Jan; 38(1): 20-30.

Cassel GH, Lindsey JR, Davis JK. Respiratory and genital mycoplasmosis of laboratory rodents: implications for biomedical research. *Isr J Med Sci*. 1981 Jul; 17(7): 548-554.

Champy MF, Selloum M, Zeitler V, Caradec C, Jung B, Rousseau S, et al. Genetic background determines metabolic phenotypes in the mouse. *Mamm Genome*. 2008 May;

19(5): 318-331.

Chen MH, Lo DY, Liao JW, Hsuan SL, Chien MS, Lin CC, et al. Immunostimulation of Sugar Cane Extract on Neutrophils to Salmonella typhimurium Infection in Mice. *Phytother Res.* 2011 Dec. doi: 10.1002/ptr.3676. [Epub ahead of print].

Chia R, Achilli F, Festing MFW, Fisher EMC. The origins and uses of mouse outbred stocks. *Nat Genet.* 2005 Nov; 37(11): 1181-6.

Coghlan LG, Lee D, Rick PB, Weiss D. Practical and effective eradication of pinworms (*Syphacia muris*) in rats by use of fenbendazole. *Lab Anim Sci.* 1993; 43: 481-7.

Coles, EH. *Veterinary Clinical Pathology.* 4th ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 1986.

Curtis MG, Walker B, Denny TN. Flow cytometric methods for prenatal and neonatal diagnosis. *J Immunol Methods.* 2011 Jan; 363(2): 198-209. PubMed; PMID 15867408. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022175910002930>. Acesso em 02 jan 2011.

De Lucca RR, Alexandre SR, Marques T. *Manual para técnicos em bioterismo.* 2ª ed. São Paulo: COBEA, FINEP; 1996.

Dvorak AM. The mouse basophil, a rare and rarely recognized granulocyte. *Blood.* 2000 Aug; 96(4):1616-7.

Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA). Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab Anim.* 2002; 36, 20–42.

Feijó, AGS, Braga LMGM, Pitrez PMC. *Animais na pesquisa e no ensino: aspectos éticos e técnicos.* Porto Alegre: EDIPCRS; 2010.

Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC. *Schalm's Veterinary Hematology.* 5th ed. Baltimore:

Lippincott Willians & Wilkins; 2000.

Ferreira CES, Andriolo A. Intervalos de referência no laboratório. J Bras Patol Med Lab. 2008 Fev; 44(1): 11-16.

Ferreira LM, Hocxhman B, Barbosa MVJ. Modelos experimentais em pesquisa. Acta Cir Brás. 2005 Nov; 20: 23-34.

Flynn RJ. Parasites of Laboratory Animals. Ames: The Iowa State University Press; 1973.

Frith CH, Suber RL, Umholtz R. Hematologic and clinical chemistry findings in control BALB/c and C57BL/6 mice. Lab Anim Sci. 1980 Oct; 30(5): 835-840.

Fujioka M, Fujiwara K, Yamanouchi K, Hayani M. Histopathology and hematology of acute infection with mouse hepatitis virus MHV-3 in mice with different susceptibility. Jpn J Vet Sci. 1985; 14: 189-192.

Gilioli, R. Avaliação do perfil sanitário de colônias de camundongos e de ratos em biotérios brasileiros: ocorrência de bactérias, parasitas e vírus murinos [Tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2003.

Godard ALB, Guénet J. Modelos Animais de Doenças Humanas. Biotecnologia cienc. desenvol. 1999; 9: 96-100.

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.

Goulart CES. Valores hematológicos de referência para papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva* – Psittacidae) mantidos em cativeiro [dissertação]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2006.

Guyton SC, Hall JE. Tratado de Fisiologia Médica. 11<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2006.

Harris EK, Yasaka T. On the calculation of a “Reference Change” for comparing two consecutive measurements. *Clin Chem*. 1983; 29: 25-30.

Hedrich HJ. (Ed). *The Laboratory Mouse*. London: Academic Press; 2004.

Hemieda FA. Influence of gender on tamoxifen-induced biochemical changes in serum of rats. *Mol Cell Biochem*. 2007 Jul; 301(1-2): 137-142.

Hoff J. Methods of Blood Collection in the Mouse. *Lab Anim*. 2000 Nov; 29(10): 47-53.

Hoffbrand AV, Pettit JE, Moss PAH. *Essential haematology*. 4th ed. Oxford: Wiley-Blackwell; 2001.

Hough TA, Nolan PM, Tsipouri V, Toye AA, Gray IC, Goldsworthy M, et al. Novel phenotypes identified by plasma biochemical screening in the mouse. *Mamm Genome*. 2002 Oct; 13(10): 595-602. PubMed; PMID 15867408. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/q9ne3avtcua7qwdc/fulltext.pdf>. Acesso em 15 jun 2010.

Hsu CK. Parasitic diseases: how to monitor them e their effects on research. *Lab Anim*. 1980; 14: 48-53.

Institute of Laboratory Animal Resources (ILAR). Long term holding of laboratory rodents. A report of the Committee on long-term holding of laboratory rodents. *ILAR News*. 1976; 19(4): 1-25.

Jacoby RO, Fox JG. Biology and diseases of mice. In: Fox JG, Cohen BJ, Loew FM, editores. *Laboratory Animal Medicine*. London: Academic Press Inc; 1984.

Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica* 10ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.

Kaplan ZS, Jackson SP. The Role of Platelets in Atherothrombosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011; 2011: 51-61. PubMed; PMID 15867408. Disponível em: <http://asheducationbook.hematologylibrary.org/content/2011/1/51.long>. Acesso em 05 ago

2011.

Kile BT, Mason-Garrison CL, Justice MJ. Sex and strain-related differences in the peripheral blood cell values of inbred mouse strains. *Mamm Genome*. 2003 Jan; 14(1): 81-5.

Klein GL, Simmons DJ. Nutricional rickets: thoughts on pathogenesis. *Ann Med*. 1993; 25: 379-86.

Klement P, Augustine JM, Delaney KH, Klement G, Weitz JI. An oral ivermectin regimen that eradicates pinworms (*Syphacia* spp.) in laboratory rats and mice. *Lab Anim Sci*. 1996; 46: 286-290.

Koga T, Kanefuji K, Nakama K. Individual Reference Intervals of Hematological and Serum Biochemical Parameters in Cynomolgus Monkeys. *Int J Toxicol*. 2005 Sep-Oct; 24(5): 377-385.

Lapchik VBV, Mattaraia VGM, Ko, GM (Orgs.). *Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório*. São Paulo: Atheneu; 2010.

Lefebvre HP. Greyhound-specific reference intervals: a good start to a long Race. *Vet Clin Pathol*. 2011 Dec; 40(4): 405-6.

Lewis SM, Bain BJ, Bates I. *Dacie and Lewis practical haematology*. 10th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone/Elsevier; 2006.

Loeb W F, Quimby FW. *Clinical chemistry of laboratory animal*. 2th ed. Philadelphia: Taylor & Francis; 1999.

Lubcke R, Hutcheson FA, Barbezat GO. Impaired intestinal electrolyte transport in rats infested with the common parasite *Syphacia muris*. *Dig Dis Sci*. 1992; 37: 60-4.

Lussier G. Potential detrimental effects of rodent viral infections on lon-term experiments. *Vet Res Commun*. 1988; 12: 199-217.

Mann MD, Crouse DA; Prentice ED. Special Topic Overview: Appropriate animal numbers em biomedical research in light of animal welfare considerations. *Lab Anim Sci.* 1991; 41: 6-14.

Majerowicz J. Procedimentos de biossegurança para as novas instalações do laboratório de experimentação animal (LAEAN) de Biomanguinhos [Dissertação]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz; 2005.

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

Mazzaccara C, Labruna G, Cito G, Scarfo` M, De Felice M. Age-related reference intervals of the main biochemical and hematological parameters in C57BL/6J, 129SV/EV and C3H/HeJ Mouse Strains. *PLoS ONE.* 2008 Nov; 3(11): e3772. PubMed; PMID 15867408. Disponível em: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0003772>. Acesso em 10 ago 2011.

Melby Jr EC, Balk MW (Eds). The importance of laboratory animal genetics, health and the environment in biomedical research. New York: Academic Press; 1983.

Migonte AS, Atuncar GS, Nogueira MLG, Silva RC. Métodos de Amostragem com aplicações na área empresarial com um enfoque integrado ao software “sampling”; 2000.

Mitruka BM, Rawnsley HM. Clinical biochemical and hematological reference values in normal experimental animals. *J Clin Pathol.* 1979 Jan; 32(1): 96.

Moulia C, Le Brun N, Dallas J, Orth A, Renaud F. Experimental evidence of genetic determinism in high susceptibility to intestinal pinworm infection in mice: a hybrid zone model. *Parasitology.* 1993 May; 106(4): 387-393.

Nakage AP, Santana AE, de Cápua ML, Godoy AV. Characterization and quantification of blood cells from the umbilical cord of dogs. *Vet Clin Pathol.* 2005 Dec; 34(4): 394-6.

National Research Council. Institute of Laboratory Animal Resources. Guide for the care and use of laboratory animals. 8th ed. Washington: The National Academies Press; 2008.

Nemzek JA, Bolgos GL, Williams BA, Remick DG. Differences in normal values for murine white blood cell counts and other hematological parameters based on sampling site. *Inflamm Res*. 2001 Oct; 50(10): 523-7.

Ono SJ, Nakamura T, Miyazaki D, Ohbayashi M, Dawson M, Toda M. Chemokines: roles in leukocyte development, trafficking, and effector function. *J Allergy Clin Immunol*. 2003; 111: 1185-1199.

Pakes, SP. Contributions of the Laboratory Animal Veterinarian to Refining Animal Experiments in Toxicology. *Fundam Appl Toxicol*. 1990 Jul; 15: 17-24.

Pakes SP, Lu YS, Meunier PC. Factors that complicate animal research. In: Fox JG, Cohen BJ, Loew FM, editors. *Laboratory Animal Medicine*. New York: Academic Press; 1984.

Pérez JM, González FJ, Granados JE, Pérez MC, Fandos P, Soriguer RC, et al. Hematologic and biochemical reference intervals for Spanish ibex. *J Wildl Dis*. 2003 Jan; 39(1): 209-215.

Peters LL, Cheever EM, Ellis HR, Magnani PA, Svenson KL, Von Smith R, et al. Large-scale, high-throughput screening for coagulation and hematologic phenotypes in mice. *Physiol Genomics*. 2002 Dec; 11(3): 185-193.

Petkova S, Roopenian D. Aging study: Peripheral blood leukocytes (PBL profiles) in 32 inbred strains of mice. MPD:24276. Mouse Phenome Database web site, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine USA. 2007. Disponível em: <http://phenome.jax.org>. Acesso em: 10 Jan 2012.

Petkova SB, Yuan R, Tsaih SW, Schott W, Roopenian DC, Paigen B. Genetic influence on immune phenotype revealed strain-specific variations in peripheral blood lineages. *Physiol Genomics*. 2008 Aug; 34(3): 304-14.

Phimister AJ, Day KC, Gunderson AD, Wong VJ, Lawson GW, Fanucchi MV, et al. Detection of viral infection in the respiratory tract of virus antibody free mice: advantages of high-resolution imaging for respiratory toxicology. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2003 Aug; 190(3): 286-293.

Picarelli MM, Kaiser GRRF, Mühlen CAV. Dosagem Laboratorial de Enzimas Musculares e Diagnóstico Equivocado de Polimiosite Juvenil: Problemas na Avaliação Clínica e na Fase Pré-Analítica. *Rev Bras Reumatol.* 2004 Mai./Jun; 44(3): 224-6.

Pinto CEC, Gremião ID, Mochiaro PR, Gilioli R, Carvalho ECQ. Control sanitário em animais de laboratório: um enfoque em infecção pulmonar. *Animales de Experimentación.* 1997; 3(2): 26-9.

Poiley SM. A systematic method of breeder rotation for non-inbred laboratory animal colonies. *Proc Anim Care Panel.* 1960; 10(4): 155-166.

Ravel R. *Clinical laboratory medicine: clinical application of laboratory data.* 6th ed. St Louis: Mosby, 1995.

Rebar, AH. General responses of the bone marrow to injury. *Toxicol Pathol.* 1993; 21(2):118-129.

Rehg JE, Toth LA. Rodent quarantine programs: purpose, principles and practice. *Lab Anim Sci.* 1998 Oct; 48: 438-447.

Repossini A, Bloch D, Muneretto C, Piccoli P, Bisleri G, Beholz S. Platelet reduction after stentless pericardial aortic valve replacement. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2012 Jan. [Epub ahead of print].

Riken BioResource Center / Experimental Animal Division. Blood chemistry, hematology, and body size for 33 RBRC wild-derived mouse strains. MPD:37811. Mouse Phenome Database web site, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine USA. 2008. Disponível em: <http://phenome.jax.org>. Acesso em 10 Jan 2012.

Rodak, BF. Diagnostic Hematology. Philadelphia: W. B. Saunders

Roitt I. Imunologia. 7<sup>a</sup> ed. São Paulo: Manole, 2003.

Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Annu Rev Immunol*. 2006; 24: 147–174.

Russell WMS, Burch RL. The Principles of Humane Experimental Technique. London, UK: Methuen; 1959.

Rusyn I, Threadgill DW. Effects of trichloroethylene in males of 17 inbred mouse strains. MPD:Rusyn2. Mouse Phenome Database web site, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine USA. 2010. Disponível em: <http://phenome.jax.org>. Acesso em 20 Feb 2012.

Salgado AR. Transferência ovariana como alternativa para a restauração das funções reprodutivas em fêmeas de camundongos irradiadas com radiação gama de 60 CO [Dissertação na internet]. São Paulo: SN; 2010 [acesso em 2011 nov 5]. Disponível em: [http://pelicano.ipen.br/PosG30/TextoCompleto/AndreiaRuisSalgado\\_M.pdf](http://pelicano.ipen.br/PosG30/TextoCompleto/AndreiaRuisSalgado_M.pdf). Acesso em 8 dez 2011.

Schepis D, Gunnarsson I, Eloranta ML, Lampa J, Jacobson SH, Kärre K, et al. Increased Proportion of CD56(bright) Natural Killer Cells in Active and Inactive Systemic Lupus Erythematosus. *Immunology*. 2009 Jan; 126(1):140-6.

Schnell MA, Hardy C, Hawley M, Propert KJ, Wilson JM. Effect of blood collection technique in mice on clinical pathology parameters. *Hum Gene Ther*. 2002 Jan; 13(1): 155-161. PubMed; PMID 15867408. Disponível em: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/10430340152712700>. Acesso em 10 ago 2011.

Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, Féraud G, Ferrero CA, Franck PF, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Part 5. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of aspartate aminotransferase. *Clin Chem Lab Med*. 2002 Jul; 40(7): 725-33. Erratum in: *Clin Chem Lab*

Med. 2010 May; 48(5): 615-621.

Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, Féraud G, Ferrero CA, Franck PF, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Part 6. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of gamma-glutamyltransferase. Clin Chem Lab Med. 2002 Jul; 40(7): 734-8.

Scott DA, Krauss J. Neutrophils in periodontal inflammation. Front Oral Biol. 2011 Nov; 15: 56-83.

Scott ME, Gibbs HC. Long-term population dynamics of pinworms (*Syphacia obvelata* and *Aspiculuris tetraptera*) in mice. J Parasitol. 1986 Oct; 72: 652-662.

Serfilippi LM, Pallmans DRS, Russel B, Spainhour CB. Serum clinical chemistry and hematology reference values in outbred stocks of albino mice from three commonly used vendors and two inbred strains of albino mice. Contemp Top Lab Anim Sci. 2003 May; 42(3):46-52.

Shahsavani D, Kazerani HR, Kaveh S, Gholipour-Kanani H. Determination of some normal serum parameters in starry sturgeon (*Acipenser stellatus* Pallas, 1771) during spring season. Comp Clin Pathol. 2010; 19: 57-61.

Silveira, JM. Patologia Clínica Veterinária: Teoria e Interpretação. Rio de Janeiro: Guanabara; 1988.

Solberg HE, Petitclerc C. Approved recommendation (1988 ) on the theory of reference values. Part 3. Preparation of individuals and collection of specimens for the production of reference values. Clin Chim Acta. 1988 Oct; 177(3): 3-11.

Souza C, Lopes STA, Batina PN, Cecim M, Cunha CM, Conrado AC, et al. Estresse parasitário em cabras saanen: Avaliação hematológica e da atividade oxidativa dos neutrófilos. Vet Not. 2006 Ago.-Dez; 12(2): 17-23.

Steel CD, Stephens AL, Hahto SM, Singletary SJ, Ciavarrá RP. Comparison of the lateral tail vein and the retro-orbital venous sinus as routes of intravenous drug delivery in a transgenic mouse model. *Lab Anim.* 2008 Jan; 37(1): 26-32.

Sueta T, Miyoshi I, Okamura T, Kasai N. Experimental eradication of pinworms (*Syphacia obvelata e Aspiculuris tetraptera*) from mice colonies using ivermectin. *Exp Anim.* 2002; 52(4): 367-373.

Svenson KL, Forejt J, Donahue L, Paigen B. Multi-system survey of mouse physiology in C57BL/6J-Chr#<sup>PWD/Ph</sup>/ForeJ chromosome substitution panel (19 strains). MPD:Svenson2. Mouse Phenome Database web site, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine USA. 2006. Disponível em: <http://phenome.jax.org>. Acesso em 4 Jan 2012.

Taft RA, Davisson M, Wiles MV. Know thy mouse. *Trends Genet.* 2006; 22(12): 649-653.

Trexler PC, Reynolds LI. Flexible film apparatus for the rearing and use of germfree animals. *Appl microbiol.* 1957 Nov; 5(6): 406-412.

Troiano JC, Gould EG, Gould I. Hematological reference intervals in argentine lizard *Tupinambis merianae* (Sauria-Teiidae). *Comp Clin Pathol.* 2008; 17: 93-7.

Turgeon ML. *Clinical hematology: theory and procedures.* 4th ed. Hagerstown: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.

Valdar W, Solberg LC, Gauguier D, Cookson WO, Rawlins JN, Mott R, et al. Genetic and environmental effects on complex traits in mice. *Genetics.* 2006 Oct; 174(2): 959-984.

Vieira JGH. Avaliação dos Potenciais Problemas Pré-Analíticos e Metodológicos em Dosagens Hormonais. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2009 Fev; 46(1): 9-15.

Weiss DJ, Wardrop KJ (Eds). *Schalm's Veterinary Hematology.* 6th ed. Ames: Wiley Blackwell, 2010.

Weisbroth SH, Peters R, Riley LK. Microbiological assessment of laboratory rats and mice. ILAR J. 1998; 39(4): 272-290.

Wirth-Dzieciolowska E, Karaszewska J, Pysniak K, Smolinska, MG. Selected peripheral blood cell parameters in twelve inbred strains of laboratory mouse. Anim. Sci. Pap. Rep.. 2009; 27: 69-77.

Wolford ST, Schroer RA, Gohs FX, Gallo PP, Brodeck M, Falk HB, et al. Reference range data base for serum chemistry and hematology values in laboratory animals. J Toxicol Environ Health. 1986; 18(2): 161-88.

Wright EM & Royston P. Calculating reference intervals for laboratory measurements. Stat Methods Med Res. 1999; 8: 93-112.

Yen MH, Weng TC, Liu SY, Chai CY, Lin CC. The hepatoprotective effect of Bupleurum kaoi, an endemic plant to Taiwan, against dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in rats. Biol Pharm Bull. 2005 Mar; 28(3): 442-8.

Yoshiki A, Moriwaki K. Mouse phenome research: implications of genetic background. ILAR J. 2006; 47(2): 94-102.

Yuan R, Korstanje R. Aging study: Blood chemistry for 32 inbred strains of mice. MPD:Yuan3. Mouse Phenome Database web site, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine USA. 2008. Disponível em: <http://phenome.jax.org>. Acesso em 4 Jan 2012.

Zenner L. Effective eradication of pinworms (*Syphacia muris*, *Syphacia obvelata* and *Aspicularis tetraptera*) from a rodent breeding colony by oral antihelminthic therapy. Lab Anim Sci. 1998; 32: 337-342.

Zhou X, Hansson GK. Effect of sex and age on serum biochemical reference ranges in C57BL/6J mice. Comp Med. 2004 Apr; 54: 176-8. PubMed; PMID 15867408. Disponível em: <http://docserver.ingentaconnect.com/deliver/connect/aalas/15320820/v54n2/s6.pdf?expire>

[s=1340998962&id=69496469&titleid=72010023&acname=Funda%C3%A7%C3%A3o+Os  
waldo+Cruz&checksum=F23579C5CE484E15D628245D2079640E](https://www.fundacao.org.br/portal/ver-noticia.php?id=69496469&titleid=72010023&acname=Funda%C3%A7%C3%A3o+Os+Waldo+Cruz&checksum=F23579C5CE484E15D628245D2079640E). Acesso em 05 ago 2011.