

# Comparação dos parâmetros bioquímicos de camundongos criados em diferentes condições sanitárias

M. O. Spinelli; R. J. Cruz; C. M. S. Godoy; M. C. Motta

*Diretoria Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa da Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 012469-03, São Paulo-SP, Brasil*

*marilda@biot.fm.usp.br*

*(Recebido em 15 de agosto de 2011; aceito em 31 de janeiro de 2012)*

---

Os analitos determinados apresentaram diferenças significativas (teste t Student e teste Mann-Whitney,  $p < 0,05$ ). Os valores de referência foram padronizados e diferenciados por espécie animal e categoria sanitária. A grande problemática ao pesquisador científico é não possuir dos centros de criação nível nacional, dados fisiológicos dos animais em estudo, forçando ao pesquisador utilizar referências relatadas pelo Sistema Internacional. Devido à carência de dados bibliográficos pareceu-nos interessante a obtenção destes parâmetros de forma a auxiliar na caracterização destes, ajudar a diferenciar animais categoria Convencional e SPF (*Specific Pathogen Free*) e contribuir no diagnóstico de algumas patologias que possam interferir nos experimentos.

Palavras chave: biotério; bioquímica; plasma; camundongos; condições sanitárias

The analytes determined significant differences (Student t test and Mann-Whitney,  $p < 0.05$ ). The reference values were standardized and differentiated by species and health category. The big problem is the research scientist does not have the national breeding centers, physiological data in the study of animals, forcing researchers to use references reported by the International System. Due to the lack of bibliographic data it seemed interesting to obtain these parameters in order to assist in the characterization of these help to differentiate animals category Conventional and SPF (Specific Pathogen Free) and contribute to the diagnosis of certain illnesses that may interfere with experiments.

Keywords: animal house; biochemical parameters; mice; plasma

---

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização de animais de laboratório em pesquisa científica tem sido de fundamental importância, não só pelos avanços que permite ao conhecimento dos mecanismos dos processos vitais, mas também ao aperfeiçoamento dos métodos de prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças tanto na Medicina Humana como na própria Medicina Veterinária [4, 7, 9,10].

O avanço tecnológico e o aprofundamento de conhecimento científico trazem consigo a necessidade dos pesquisadores dominarem com maior precisão o desenvolvimento da pesquisa, numa busca cautelosa pelo controle das variáveis que possam interferir diretamente no resultado final de um estudo. Nesse sentido, estudos que avaliem o nível de estresse, grau de ansiedade, temperatura ambiente e controle sanitário, apresentam valores importantes na influência do perfil bioquímico destes animais [1,2].

Fatores relacionados à metodologia e à amostragem, além da espécie animal podem influenciar nas condições ideais de conservação dos perfis analisados [8]. Desse modo, temos como objetivo determinar se existem diferenças na fisiologia bioquímica quando utilizamos animais de mesma espécie, mas linhagens e condições sanitárias diferentes [10].

Curiosamente, poucos laboratórios se dedicam a estabelecer seus próprios intervalos de referência quando utilizam plasma/soro de animais, alternativamente eles adotam os intervalos de referência que constam nas instruções de uso dos fabricantes dos reagentes [35] ou seguem criadouros internacionais [6].

Criar o próprio perfil de referência pode ser dispendioso e exaustivo para o laboratório, pois seriam necessárias amostragens acima de 120 animais ditos sadios como controle, de acordo

com linhagem, sexo e idade de cada espécie utilizada conforme recomendado pela International Federation of Clinical Chemistry (IFCC).

No entanto é possível realizar rápida revisão de intervalos de referência coletando amostras de 20 animais por linhagem/sexo, determinando a curva linear logarítmica para cada dosagem [4]. O grande problema para quem utiliza animais de laboratórios é que essas instruções não são relatadas ao pesquisador deixando este a mercê de referências humanas. É claro que a necessidade do estabelecimento de intervalos de referência próprio para cada Biotério é de suma importância, pois assim eles refletem as condições da população na qual cada teste será aplicado [10, 21, 22,28].

## 2. MATERIAL E MÉTODO

### *Animais*

Os animais foram separados aleatoriamente por sexo (machos-fêmeas) em quantidades de 80 camundongos das seguintes linhagens: C57Bl/6 e Balb/c, todos acima de 10 semanas Federation of European Laboratory Animal Science Association (FELASA) [7,12,13], provenientes do Biotério Convencional e SPF do Centro de Bioterismo - FMUSP, enviados ao laboratório de Controle de Qualidade Genética e Sanitária (CBFMUSP), para determinação das dosagens bioquímicas.

### *Parâmetros Bioquímicos*

Procedeu-se a coleta de sangue por punção retro-orbital, após pré-anestesia com CO<sub>2</sub> e aproximadamente 800µl de sangue total / animal, as amostras foram acondicionadas em microtubos com anticoagulante EDTA (ácido tetracético) na concentração de 10 mg/dL. [20,21].

O plasma foi separado por processo de centrifugação (EPPENDORF, 5804) a 2.500rpm / 10 minutos, obtendo-se plasma livre de hemólise [20]. Os processos das análises bioquímicas constaram das dosagens de: bilirrubina total e frações (DIRETA, INDIRETA), cloretos, magnésio, triglicérides, transaminases (TGO/TGP), amônia, cálcio, uréia/BUN, creatinina, proteínas totais, albumina/globulinas, ferro, fósforo, glicose, colesterol total e suas frações (LDL, HDL, VLDL).

Os ensaios foram realizados por sistema de identificação-espectrofotométrica em analisador bioquímico semi-automatizado (COBAS MIRA-ROCHE DIAGNOSTIC SYSTEM), com utilização de Kits comerciais Bioclin /Biosystems e Labtest.

## 3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Nas tabelas 1 e 2 estão descritos a média, o desvio padrão e os intervalos de confiança (IC) dos analitos. Nos parâmetros analisados verificamos diferença significativa entre as linhagens e categorias sanitárias ( $p < 0.05$ ), utilizando o programa estatístico “prisma 5”, teste *t-Student* (paramétrico) com índice de confiança de interferentes de 90% [9,12].

Para a avaliação dos resultados foram empregados também teste *U* (não paramétrico). O teste *U* de *Mann-Whitney* é uma alternativa não paramétrica ao t-teste para amostras independentes. O procedimento organiza os dados da mesma maneira como o t-teste para amostras independentes, assumindo que a variável em consideração estava pelo menos mensurada em nível ordinal. A interpretação do teste é essencialmente idêntica à interpretação do resultado de um t-teste para amostras independentes, a não ser que o teste *U* seja baseado em soma de pontos em lugar de médias.

O teste *U* é uma das mais sensíveis não paramétricas para o t-teste utilizando amostras independentes. De fato, em algumas instâncias pode oferecer até mesmo maior poder de rejeitar a hipótese nula que o t-teste. Os resultados pareados foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de “p” for menor ou igual a 0,05 (5%).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados estão demonstrados e resumidos nas *tabelas 1 e 2* relacionando às linhagens (C57Bl/6 e Balb/c) convencionais e SPF – *Specific Pathogen Free*, onde a variável idade é de suma importância [25].

Os resultados encontrados provavelmente são pertinentes a variante categoria sanitária. Estas diferenças observadas podem ser atribuídas a vários fatores: local de coleta, prévia de jejum ou não, tipo de metodologia aplicada, linhagem estudada, tipo de alimentação, estado ambiental, estresse, dentre outros, mesmo quando a unidade utilizada na análise for à mesma [23].

Quando comparados os resultados dos animais C57Bl/6 (machos) convencionais com SPF (figura 1), encontramos variações de perfil. A concentração plasmática em relação às transaminases (AST/ALT), ferro, bilirrubina total e frações, colesterol total e suas frações, juntamente com os triglicérides, demonstraram junto a outras provas funcionais a hiperfuncionalidade do fígado, rins, função nutricional e vascular, apresentando-se superiores nas linhagens convencionais [10, 15,21]. O cálcio e cloretos apresentaram-se diversificados no seu resultado, hora superior ou inferior aos descritos por outros autores [3,11].

Para os resultados de C57Bl/6 (fêmeas) convencionais comparadas com SPF (figura 2), verificou-se o aumento de cloretos, ferro, cálcio, amônia e colesterol LDL, nas dosagens determinadas resultando certa dispersão de valores podendo ocasionar disfunção renal, de fígado e talvez comprometimento ósseo para a categoria convencional.

Ao compararmos C57Bl/6 (machos e fêmeas) SPF, mesma linhagem e categoria sanitária, deparamos com grandes semelhanças para a maioria dos analitos determinados, apresentando apenas um aumento de cloretos nos machos e pré disfunção hepática nas fêmeas.

Já para C57Bl/6 (machos e fêmeas) convencionais, a disfunção aparece no aumento de cloretos, triglicérides, ferro, colesterol total e LDL para ambos os sexos, diferenciando em cálcio e amônia para fêmeas, levando-nos a crer que a ação hormonal pode ser responsável pela tal situação.

No caso de BALB/c (machos) convencionais x SPF (figura 3), verificamos que as transaminases (ALT/AST), cloretos, triglicérides, glicose e cálcio apresentam-se aumentados para categoria SPF e o aumento de ferro, colesterol total e HDL para convencionais.

Os intervalos de referência de valores laboratoriais na comparação de BALB/c (fêmeas) convencionais x SPF (figura 4), mostraram certo aumento nas transaminases (ALT), glicose e triglicérides para categoria SPF e aumento de ferro, cloretos, colesterol total e LDL para categoria convencional.

Analisando BALB/c (machos e fêmeas) convencionais, observamos que apresentam grande semelhança nos parâmetros para cloretos, ferro, colesterol total se diferenciando apenas para fração do colesterol (HDL/LDL), mais uma vez nos salientando a atenção na preocupação hormonal característica para fêmeas.

E finalmente a comparação entre BALB/c (machos e fêmeas) SPF, os triglicérides aparecem aumentados para fêmeas e cloretos e cálcio para machos.

Assim sendo, sugerimos ao pesquisador maiores cuidados na escolha dos animais, principalmente em estudos que se fazem necessárias determinadas provas funcionais [1,2].

Quando utilizamos diferentes métodos para determinação de provas enzimáticas podemos resultar em valores muito discrepantes [9,10]. A comparação com outros estudos nas mesmas condições de umidade, temperatura e pH demonstram que as variações entre espécies, linhagens e categoria sanitária determinam valores de referência variável [15, 16,17].

Novas amostras devem ser analisadas quando existirem discrepâncias entre as interpretações clínicas ou biológicas das amostras. Recomendamos que as análises sejam individuais e por linhagem, não utilizando pool, visto que cada animal poderá apresentar valores diferenciados de acordo com sua categoria sanitária [22].

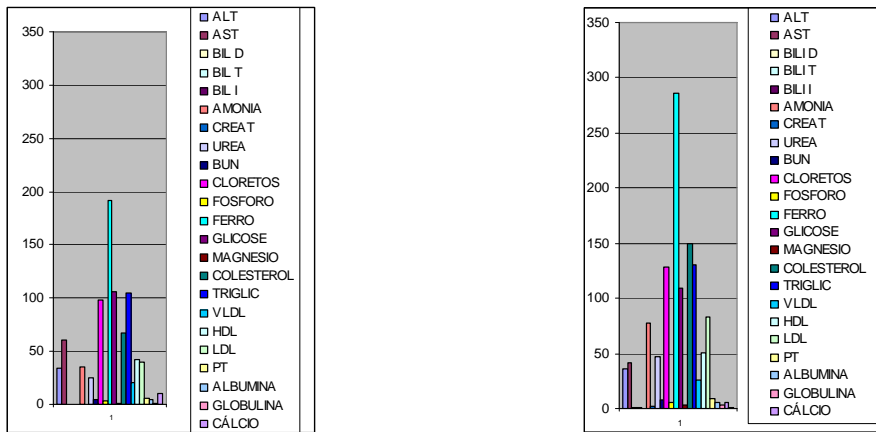


Figura 1: Distribuição dos valores das provas funcionais obtidas pelas medianas C57Bl/6 (machos SPF) x C57Bl/6 (machos convencionais)

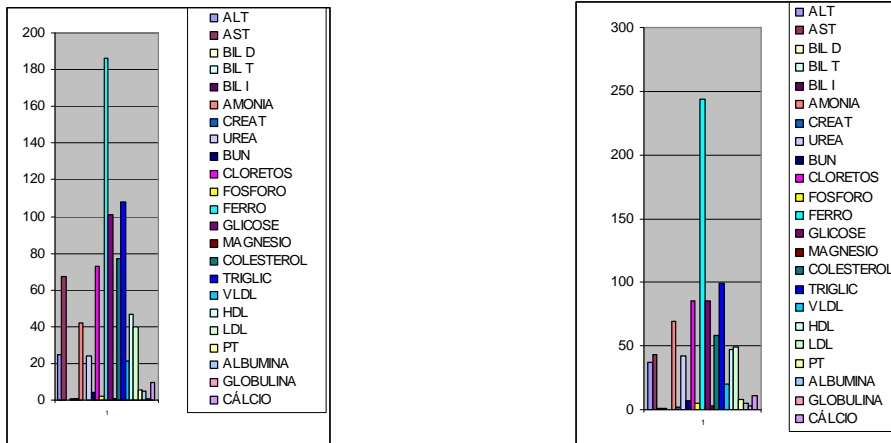


Figura 2: Distribuição dos valores das provas funcionais obtidas pelas medianas C57Bl/6 (fêmeas SPF) x C57Bl/6 (fêmeas convencionais).

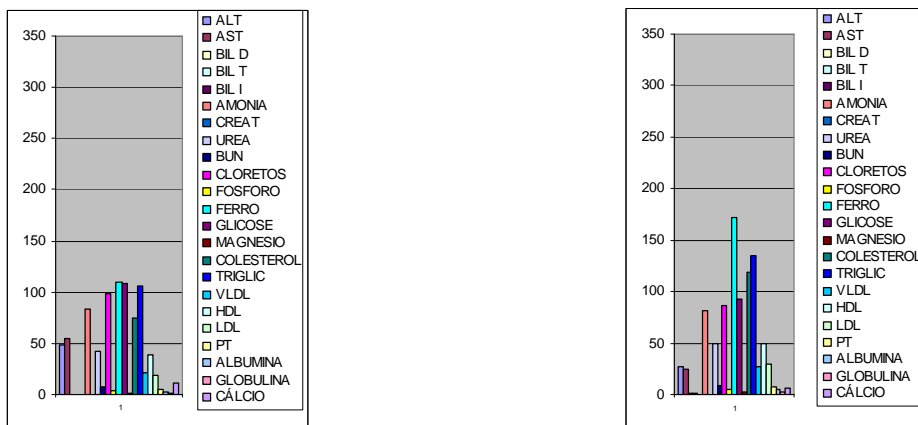


Figura 3: Distribuição dos valores das provas funcionais obtidas pelas medianas Balb/c (machos SPF) x Balb/c (machos convencionais).

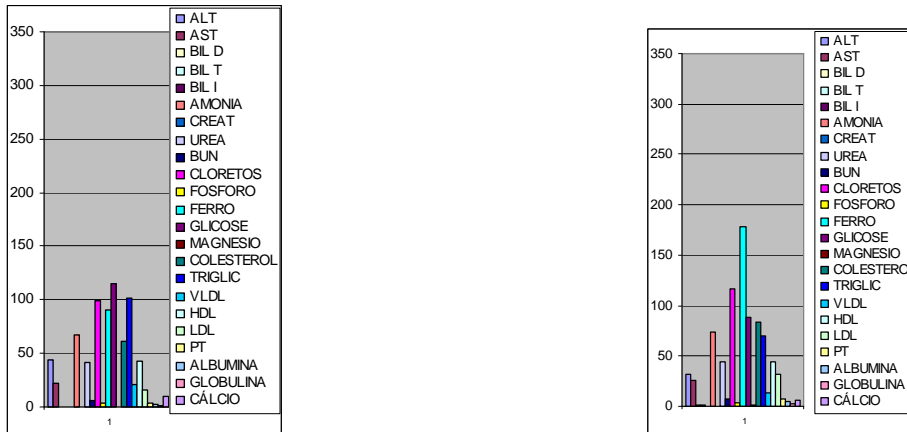


Figura 4: Distribuição dos valores das provas funcionais obtidas pelas medianas Balb/c (fêmeas SPF) x Balb/c (fêmeas convencionais).

Tabela 1. Valores Bioquímicos de camundongos C57Bl/6-SPF e Convencionais oriundos do Centro de Bioterismo da FMUSP.

	LINHAGEM	C57Bl/6 - SPF		C57Bl/6	
	SEXO	♂	♀	♂	♀
	IDADE	> 10 sem	> 10 sem	> 10 sem	> 10 sem
PARÂMETROS	UNIDADE	RESULTADOS			
TGP / ALT	U/L	35.40±11.53	24.60±6.56	36.00±7.45	37.00±21.37
TGO / AST	U/L	60.6±24.14	67.60±29.65	41.11±3.38	43.60±0.26
Bilirrubina Direta	mg/d L	0.02±0.01	0.02±0.01	0.64±0.11	0.64±0.11
Bilirrubina Total	mg/d L	0.57±0.04	0.40±0.11	0.88±0.26	0.88±0.26
Bilirrubina Indireta	mg/d L	0.50±0.03	0.37±0.11	0.24±0.09	0.24±0.09
Amônia	mg/d L	35.27±7.58	42.10±8.55	78.18±11.59	69.28±9.95
Creatinina	mg/d L	0.15±0.02	0.15±0.02	1.75±0.42	1.61±0.18
Uréia	mg/d L	24.84±4.56	24.02±6.54	47.10±6.98	41.74±5.99
BUN-Uréia	mg/d L	4.13±0.76	4.00±1.08	7.84±1.16	6.95±1.00
Cloretos	mEq/L	98.12±21.30	72.59±23.45	128.20±42.74	85.41±11.27
Fósforo	mg/d L	3.14±1.98	2.30±0.65	5.74±1.35	5.12±1.32
Ferro Sérico	mg/d L	191.20±25.60	186.56±24.12	286.20±46.22	244.30±96.30
Glicose	mg/d L	106.40±23.07	101.32±32.80	109.00±26.69	85.40±11.27
Magnésio	mg/d L	0.60±0.00	0.60±0.00	3.19±0.96	3.02±0.99
Colesterol	mg/d L	67.80±15.24	77.20±20.64	149.80±33.51	58.40±3.44
Triglicérides	mg/d L	104.40±16.23	108.23±33.55	130.40±26.69	99.00±4.33
VLDL	mg/d L	20.00±0.00	21.60±6.71	26.08±5.34	19.80±0.874
HDL	mg/d L	42.20±2.99	46.41±4.45	51.20±6.64	46.80±5.27
LDL	mg/d L	40.00±4.16	40.00±23.67	83.80±23.34	49.62±21.52
Proteínas Totais	mg/d L	6.15±17.97	5.24±0.45	8.53±16.13	7.98±15.00
Albumina	mg/dL	4.37 ±1.44	4.53±0.41	5.42±7.95	5.00±2.45
Globulina	mg/dL	1.06±4.27	0.88±0.26	2.87±1.16	2.98±1.66
Cálcio	mg/d L	10.52±0.22	9.86±0.15	6.16±2.73	11.20±2.33

Tabela 2. Valores Bioquímicos de camundongos Balb/c-SPF e Convencionais oriundos do Centro de Bioterismo da FMUSP.

PARÂMETROS	LINHAGEM	Balb/c - SPF		Balb/c	
	SEXO	♂	♀	♂	♀
	IDADE	> 10 sem	> 10 sem	> 10 sem	> 10 sem
PARÂMETROS	UNIDADE	RESULTADOS			
TGP / ALT	U/L	48.60±7.58	44.33±4.78	27.00±5.12	31.60±4.50
TGO / AST	U/L	55.00±24.14	21.66±12.60	24.20±6.11	25.20±7.78
Bilirrubina Direta	mg/d L	0.16±0.01	0.42±0.89	0.76±0.07	0.76±0.07
Bilirrubina Total	mg/d L	0.26±0.06	0.51±0.49	0.88±0.26	0.88±0.26
Bilirrubina Indireta	mg/d L	0.10±0.02	0.37±0.32	0.12±0.25	0.12±0.25
Amônia	mg/d L	83.61±28.48	67.53±21.31	81.89±8.50	73.20±8.42
Creatinina	mg/d L	0.12±0.03	0.14±0.09	0.27±0.06	0.24±0.07
Uréia	mg/d L	41.98±10.77	41.00±12.46	49.34±5.12	44.10±5.07
BUN-Uréia	mg/d L	6.99±1.79	6.16±2.31	8.22±0.85	7.34±0.84
Cloretos	mEq/L	98.16±4.29	99.00±0.81	86.80±8.62	116.80±24.76
Fósforo	mg/d L	4.12±0.06	3.89±1.20	4.95±1.02	3.13±1.51
Ferro Sérico	mg/d L	109.89±23.12	90.00±21.60	171.70±35.92	177.50±52.73
Glicose	mg/d L	107.83±10.42	115.01±11.34	92.70±15.86	88.60±6.44
Magnésio	mg/d L	0.93±0.01	0.99±0.02	2.77±0.86	1.42±0.93
Colesterol	mg/d L	74.33±9.44	61.03±17.37	119.20±18.78	83.80±8.20
Triglicérides	mg/d L	106.33±22.79	101.33±10.84	135.10±17.33	69.59±13.05
VLDL	mg/d L	21.30±4.47	20.30±2.19	27.02±3.46	13.94±2.60
HDL	mg/d L	38.67±2.42	42.51±21.95	50.00±0.00	44.00±5.09
LDL	mg/d L	19.21±7.57	15.79±5.27	29.60±15.42	32.40±2.06
Proteínas Totais	mg/d L	4.76±0.39	4.24±0.18	7.96±3.00	7.72±8.24
Albumina	mg/dL	2.84±0.87	2.74±0.07	4.96±4.11	5.42±7.43
Globulina	mg/dL	1.43±0.16	1.59±0.15	2.30±2.00	2.48±1.72
Cálcio	mg/d L	11.25±0.73	10.23±2.27	6.71±1.89	6.71±2.89

\* Exames realizados pelo Laboratório de Controle de Qualidade Sanitária Animal do C.B - FMUSP.

## 5. CONCLUSÃO

Muitos modelos de animais de laboratório vêm sendo utilizados para investigar a relação entre a ordem e/ou desordem no metabolismo bioquímico destes [18,19].

O acompanhamento e avaliação do controle bioquímico do plasma/soro, realizados em animais ditos normais fenotipicamente para as linhagens em estudo, apresentaram resultados que exibem valores analisados num período de 2 anos. A média do conjunto de valores obtidos e variações presentes oferecem valiosa referência para pré-seleção de animais para procedimentos experimentais quando provenientes do Centro de bioterismo da Faculdade de Medicina da USP.

Finalmente, a análise comparativa dos nossos resultados demonstra claramente que variações intraespécies existem, sendo provavelmente resultante da categoria sanitária, bem como do manuseio e/ou metodologia aplicados.

1. BRINCO, AV. *Análise do perfil lipídico em animais submetidos a um modelo de estresse ambiental*. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Gestão Tecnológica em Qualidade Ambiental do Centro Universitário Fevale, 40, (2007).
2. SANTOS MRV, SOUZA VH, MENEZES IAC, BITENCURT JL, REZENDE-NETO JM, Parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos de ratos produzidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe. *Scientia Plena*, 6(1): 1-6, (2010).
3. MITRUKA B.M. & RAWNSLEY H. M., *Clinical biochemical and hematological reference values in normal experimental animals*, New York: Masson Publishing, p. 73-83, 134-135, (1977).
4. CLINICAL LABORATORY AND STANDARDS INSTITUTE. "How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory; approved guideline-second edition" CLSI document C28-A2. Wayne PA. (2000).
5. FRANCO, M. Centro de desenvolvimento de modelos experimentais: CEDEME/COBEA da Universidade de São Paulo. [www.cobea.org.br/animais/html,2005](http://www.cobea.org.br/animais/html,2005).
6. C.C.A.C. – Canadian Council on Animal Care, Guide to the care and use of experimental animals, v.1, p.86-88, (1984).
7. GREEN, E. Biology of the laboratory mouse. New York, NK: *Mc Graw-Hill Book Co.*, (1986).
8. DAVY CM, JACKSON MR, WALKER JM. Stabilities of some constituents of marmoset plasma under various conditions of storage. *Clin Chem*, 30:101-104, (1984).
9. ALMEIDA SA, FALEIROS ACG, TEIXEIRA DNS, COTA UA, CHICA JEL, Valores de referência de parâmetros bioquímicos no sangue de duas linhagens de camundongos, *J. Bras Patol Med Lab*, 44(6): 429-432, (2008).
10. FERNANDES ST, TEIXEIRA ES, SANTOS ES. Influencia da temperatura e do tempo de armazenamento das dosagens bioquímicas de uréia e creatinina em soro ou plasma caninos. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 53(6)1-7,(2001).
11. WOLFORDS.T.,SCHROER,R.A.,GHSF.X.,GALLO,P.P.,BRODECK,M.,FLAK,H.B.,RUHREN,R., Reference range data base for serum chemistry and hematology values in laboratory animals. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 18, 161-188,(1986).
12. BEIGUELMEN B., Curso prático de bioestatística, *Revista Brasileira de Genética*, p.135-152, (1991).
13. HARKNESS J.E. AND WAGNER J., *Biologia e Clínica de Roedores*, 1 ed., Roca Ltda., (1993).
14. RAPKIEWICZ K., MEDINA L., HOLMES D.D., *Clinical Laboratory animal medicine an introduction*, 2 ed. Ames: Iowa State University Press,277p.,(1998).
15. YOSHIDA H.S., SPINELLI M.O., GUEDES R., CRUZ R.J., DAMY S.B., TAKANO J.O., TOLOSA E.M.C., Valores hematológicos e bioquímicos em linhagens de camundongos isogênicas A.Snell, Balb/c, C57Bl/6J e heterogênica suíça, *Rev. Bras. Méd. Vet.* 22(3): 122-124, (2000).
16. CENTRO DE BIOTERISMO DA FACULDADE DE BIOTERISMO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-USP, Parâmetros dos Principais Animais de Experimentação, 2000, [www.biot.fm.usp.br/site1/index-2.html](http://www.biot.fm.usp.br/site1/index-2.html).
17. SACHER R.A., MCPHERSON R.A., *Interpretação Clínica dos exames laboratoriais*, 11o.ed. (2000).
18. NICOLÓSI M., Centro de bioterismo da medicina da USP produz animais especiais para pesquisas, *Rev. Controle de Contaminação*, 6(41): 52-56, (2002).
19. RODRIGUES U.P., MATTARAIA V.G.M., VALENTINI E.J.G., DAMY S.B., Implantação de Boas práticas de produção (cGMP) no biotério central do Instituto Butantã, *Rev. Controle de Contaminação*, 6(49):20-24,(2003).
20. ZHOU X. Effect of sex and age on serum biochemical reference ranges in C57Bl6J mice. *Comp Med*, 54:176-178, (2004).
21. DANTAS JA, AMBIEL CR, CUMAN RKN, BARONI S, AMADO CAB, Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério central da Universidade Estadual de Maringá, estado do Paraná, *Acta Sci. Health Sci*, 28(2)165-170, (2006).
22. ALMEIDA A.S., FALEIROS A.C.G., TEIXEIRA D.N.S., COTA U.A. & CHICA J.E.L., Valores de referência de parâmetros bioquímicos no sangue de duas linhagens de camundongos. *J.Bras. Patol. Med. Lab.* 44:429-432,(2006).
23. ANDRIOLO A., ROCHA M.H., *Características e interpretação dos resultados dos exames laboratoriais*, 2 ed., cap. 1, p. 3-13, Sarvier/SP, (2007).
24. MAZZACCARA C., et al. Age-related reference intervals of the mains biochemical and hematological parameters in C57Bl6, 129SV/EV and C3H/HeJ mouse strains, *PLOS one*,3(11):3772,(2008).
25. FERREIRA E.S., ANDRIOLO A., Intervalos de referência no laboratório clínico, *J.Bras. Patol. Med. Lab*, 44(1): 11-16, (2008).

26. Horowitz GL. Reference intervals: practical aspects. *Journal International Federation of Clinical Chemistry* (eJIFCC) 19: 1 – 11, 2008.
27. BARRIOS M., ACOSTA A.R., GIL A., SALAZAR A.M., TAYLOR P., SANCHEZ E.E., PIÑANGO C.L.A., GUERRERO B., Comparative hemostatic parameters in Balb/c, C57Bl/6 and C3H/He mice, *Thrombosis Research*, 124.:338-343, (2009).
28. HOOPER C., JUSTEN A., OLIVEIRA M., FARIA E., LANNA C., RAMOS S., MAJEROWICZ J., Valores Bioquímicos de camundongos da linhagem C57BL/6, Simpósio de Animais de laboratório, SBCAL, (2009).