

Parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) produzidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe

M. R. V. Santos¹; V. H. Souza¹; I. A. C. Menezes¹; J. L. Bitencurt²; J. M. Rezende-Neto³; A. S. Barreto¹; F. A. Cunha¹; R. M. Marçal¹; F. Teixeira-Silva; L. J. Quintans-Júnior¹; A. P. O. Barbosa¹

1 Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Sergipe, 49100-000, São Cristóvão-SE, Brasil

2 Laboratório Médico de Análises Biológicas Ltda, 49100-000, Aracaju-SE, Brasil

3 Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Tiradentes, 49100-000, Aracaju-SE, Brasil

marcio@infonet.com.br

(Recebido em 1º de julho de 2010; aceito em 26 de outubro de 2010)

É imprescindível que cada laboratório conheça o conjunto de valores de referência de seus animais saudáveis, de acordo com a espécie, a dieta, a linhagem, o sexo e a idade. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo estabelecer valores de referência de alguns parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos de ratos provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe. Para tanto, foram avaliados parâmetros bioquímicos plasmáticos (glicose, frutose, triglicerídeos, colesterol total, colesterol HDL e LDL, uréia e creatinina), fisiológicos (pressão arterial sistólica, diastólica, média e de pulso, frequência cardíaca e ingestão hídrica) e morfológicos (índice de massa cardíaca e hepática) em ratos adultos jovens, machos, saudáveis, da linhagem Wistar. Os resultados demonstraram que a maior parte dos parâmetros avaliados no presente estudo não diferiu daqueles obtidos de animais provenientes de outros biotérios. Além disso, os valores obtidos poderão servir como referência para estudos futuros, melhorando a padronização de protocolos experimentais, ao facilitar a identificação de animais com parâmetros anormais.

Palavras-chave: biotério, ratos wistar, valores de referência.

It is essential that each laboratory knows its own set of reference values for healthy animals, according to their species, diet, strain, gender and age. This study aimed to establish reference values of some biochemical, physiological and morphological parameters of rats from the Central Animal Facility of the Federal University of Sergipe. We used male Wistar rats, weighing between 230 and 260 g. We evaluated biochemical (glucose, fructosamine, triglycerides, total cholesterol, HDL and LDL cholesterol, urea and creatinine), physiological (systolic, diastolic, mean and pulse blood pressure, heart rate and water intake) and morphological (body weight, heart and liver mass index) parameters. With the results of this study it is possible for researchers to identify deviations from normal parameters, thus facilitating the standardization of the laboratory animals.

Keywords: biotery, wistar rats, reference values.

1. INTRODUÇÃO

O avanço tecnológico e o aprofundamento do conhecimento científico trazem consigo a necessidade dos pesquisadores dominarem com maior acurácia e precisão no desenvolvimento da pesquisa, numa busca cautelosa pelo controle de variáveis que podem interferir diretamente no resultado final do estudo. Nesse sentido, estudos que avaliaram o nível de estresse, grau de ansiedade, temperatura e ambiente, apresentaram valores importantes da influência dessas variáveis sobre parâmetros bioquímicos e fisiológicos em animais [1].

Geralmente, os valores de parâmetros fisiológicos dos animais de experimentação são determinados em países de longa tradição na manutenção de biotérios que passam a ser admitidos como constantes para os animais de uma mesma linhagem, espalhados pelos mais diversos países [2]. No entanto, tais parâmetros podem variar de acordo com sexo, linhagem, genótipo e serem influenciados pela idade, dieta, manuseio, ambiente, entre outros fatores. Na comparação de alguns parâmetros avaliados em diferentes estudos com ratos Wistar saudáveis como Guimarães & Mazáro [3] Centro de Bioterismo da FMUSP [4], Harkness & Vagner [5],

Canadian Council on Animal Care [6] foi possível observar algumas discrepâncias, o que confirma as variações intraespécies decorrentes de diferenças geográficas e de manuseio, anteriormente citadas. Neste contexto, é imprescindível que cada laboratório ou biotério estabeleça um conjunto próprio de valores de referência biológicos dos animais sadios controle, de acordo com a linhagem, sexo e idade de cada espécie utilizada.

O estabelecimento desses valores de referência permite avaliar com maior acurácia a homeostase e as modificações induzidas por processos patológicos, assim como avaliar os resultados obtidos nos procedimentos experimentais provenientes de intervenções terapêuticas [7].

No intuito de estabelecer valores de referência para que possam ser utilizados pelos laboratórios de pesquisa da Universidade Federal de Sergipe (UFS) e dessa forma permitir ao pesquisador identificar desvios da homeostasia, o objetivo deste trabalho foi avaliar os parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos de ratos adultos jovens, machos, da linhagem Wistar provenientes do Biotério Central da UFS.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais

Foram utilizados 40 ratos machos, adultos jovens, Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), selecionados aleatoriamente, pesando entre 230 a 260 g e provenientes das colônias mantidas no Biotério Central da UFS. Os animais foram acomodados em caixas de polipropileno (49 x 34 x 16 cm), com cama de maravalha, mantidos no mesmo ambiente (sala), com condições controladas de temperatura de $22 \pm 1^\circ \text{C}$ e ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso à alimentação (Ração Labina, Purina, Paulínia, SP) e água. Todos os protocolos experimentais estão em conformidade com os critérios éticos adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Sergipe.

2.2. Parâmetros fisiológicos

2.2.1. Variáveis Cardiovasculares

Os parâmetros cardiovasculares avaliados foram pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD), média (PAM), pressão de pulso (PP) e frequência cardíaca (FC). Os animais ($n = 20$) foram anestesiados com 45 mg/kg, i.p., de tiopental sódico (Thiopentax, Cristália, Itapira, SP, Brasil) e através de uma incisão inguinal esquerda, cateter de polietileno foi introduzido na artéria aorta abdominal via artéria femoral esquerda para medida direta da pressão arterial. Os cateteres foram conduzidos subcutaneamente pelo dorso do animal, exteriorizados na região cervical posterior, preenchidos com solução salina heparinizada e por fim as incisões foram suturadas. Após 24 horas de recuperação pós-operatória, com os animais conscientes e permitida mobilidade espontânea, o cateter arterial foi conectado a um transdutor de pressão pré-calibrado (Edwards Lifescience, Irvine, CA, USA) acoplado a um amplificador (BioData, Modelo BD-01, PB, Brasil) e conectado a um micro-computador equipado com placa conversora analógico-digital (BioData, PB, Brasil). Após 10 minutos de estabilização dos parâmetros hemodinâmicos, os valores de PA e FC foram registrados durante 10 minutos.

2.2.2. Ingesta Hídrica

A ingesta hídrica foi medida em vinte animais, utilizando-se garrafas preenchidas com 500 mL de água, nas quais a variação de volume foi verificada após período de 24h, por meio de provetas graduadas.

2.3. Parâmetros biológicos e morfológicos

Os mesmos animais utilizados na avaliação da ingesta hídrica foram submetidos a jejum de 12 h, anestesiados com éter e cirurgiados para exposição da aorta abdominal. Amostras de sangue foram coletadas através de punção da aorta utilizando-se uma seringa heparinizada. O plasma foi separado após centrifugação das amostras a 3.000 rpm por 15 minutos. Foram realizadas dosagens da glicose, frutossamina, triglicérides, colesterol total, HDL-colesterol, uréia e creatinina plasmáticas utilizando kits enzimáticos (LABTEST). A leitura foi realizada através de um espectrofotômetro (AUTOLAB, Boehringer, Alemanha) e o nível sérico de LDL-colesterol foi calculado usando a equação de Friedewald [LDL= Colesterol total – (Triglicérides/5) - HDL]. Após a retirada da amostra de sangue, o coração e fígado foram lavados com salina, secos em papel de filtro e pesados em balança de precisão. Os valores de peso úmido foram normalizados pelo peso corporal total.

2.4. Análise estatística

Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.)

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo foram estabelecidos alguns valores de referência bioquímicos, fisiológicos e morfológicos de ratos provenientes do Biotério Central da UFS, com o intuito de permitir a verificação do estado de homeostasia desses animais de experimentação e a comparação com valores obtidos por outros pesquisadores.

A média de peso corporal de todos os animais avaliados foi de $251,0 \pm 2,5$ g. Os parâmetros bioquímicos avaliados estão representados na tabela 1 e comparados com valores de outros estudos e centros de referência.

Nesta tabela pode-se observar que a concentração plasmática de glicose foi similar àquela encontrada no estudo de Harkness & Vagner [5] e Canadian Council on Animal Care [6]. O valor de frutossamina encontrado em nosso trabalho foi próximo aos encontrados por Nandhini et al [8] e Rajasekar & Anuradha [9] em animais controles. Quanto ao perfil lipídico, os níveis séricos de triglicérides mantiveram-se abaixo da maioria das referências, entretanto dentro da faixa apresentada por Harkness & Vagner [5] e próximo aos animais controles dos estudos de Adeneye & Agbaie [10] e de Rodrigues [11]. A comparação do colesterol total permitiu verificar semelhanças com a maioria dos estudos citados, no entanto divergiu das preconizadas pelo Centro de Bioterismo da FMUSP [4] e Canadian Council on Animal Care [6]. O valor do HDL-colesterol mostrou-se diferente na maioria dos estudos, porém semelhante aos de Dantas et al [12] e Matos et al [13]. O resultado do LDL-colesterol demonstrou-se semelhante ao de Guimarães & Mazáro [3] e outros estudos como Soares et al [14], entretanto com valores inferiores aos obtidos pelo Centro de Bioterismo da FMUSP [4].

Os valores de uréia descritos pelo Centro de Bioterismo da FMUSP [4] é o que mais se aproxima das nossas amostras, no entanto Harkness & Vagner [5] e Canadian Council on Animal Care [6] se encontram diferentes das nossas amostras. Já a creatinina demonstrou compatibilidade com todas as referências analisadas na tabela e com os valores encontrados por Rodrigues [11].

Como pode ser observado, o valor médio dos diversos parâmetros bioquímicos realizados neste estudo apresentaram-se comparáveis com alguns estudos e divergentes em outros. Isso pode ser explicado pela própria diferença, entre os valores de referência, de cada estudo citado na tabela.

Tabela 1: Comparação de parâmetros bioquímicos plasmáticos de ratos, obtidos neste estudo, com valores de outras pesquisas e fontes de referência

Parâmetros (mg/dL)	Ref 1	Ref 2	Ref 3	Ref 4	Ref 5	Média UFS ± E.P.M. (n)
Glicemia	116,1 ± 9,6	150,7-207,5	50-135	84,7 - 131,9	108 ± 17,4 (64)	85,0 ± 22,5 (20)
Frutosamina	---	---	---	---	---	0,97 ± 0,23 (10)
Triglicerídeos	83,7 ± 11	110-174,8	26-145	---	82 ± 24,7 (38)	47,6 ± 8,4 (20)
Colesterol Total	62,8 ± 13	98,9-110,2	40-130	21,6 - 42,8	87 ± 18,1 (51)	75,0 ± 10,3 (20)
HDL-colesterol	16 ± 4,9	11,4-20,4	---	---	48 ± 11,4 (37)	49,3 ± 9,6 (20)
LDL-colesterol	15,3 ± 8,3	76,3-88,5	---	---	---	20,3 ± 12,3 (20)
VLDL-colesterol	19,9 ± 5,1	15,2-26,5	---	---	---	9,5 ± 0,4 (20)
Uréia	---	41-44,6	15-21	205,5 - 47,0	48 ± 7,6 (35)	35,2 ± 1,31 (20)
Creatinina	---	0,3-0,6	0,2-0,8	---	0,5 ± 0,07 (42)	0,6 ± 0,02 (20)

Ref 1: Guimarães & Mazáro, Unifesp [3]

Ref 2: Centro de Bioterismo da FMUSP [4]

Ref 3: Harkness & Vagner [5]

Ref 4: Canadian Council on Animal Care [6]

Ref 5 : Dantas et al [13]

--- Valores não pesquisados

Obs: Os valores estão expressos ou em média ± desvio padrão da média (Ref 1 e Ref 5), ou em intervalos (Ref 2, Ref 3 e Ref 4), ou em média e erro padrão da média.

A tabela 2 demonstra os resultados de variáveis fisiológicas cardiovasculares e ingesta hídrica obtidos no presente estudo. Podemos observar que a PAS manteve-se maior quando comparada com dados apresentados por Carvalho *et al.* [7] ($119,5 \pm 3$ mmHg), já a PAD permaneceu dentro dos valores preconizados pela literatura [7,15]. Apesar da discreta elevação da PAS, a PAM apresentou-se próxima aos valores encontrados por Carvalho *et al.*, [7] ($100,3 \pm 2,2$ mmHg). A frequência cardíaca está de acordo com os dados apresentados em outros trabalhos [6, 7, 15]. Em relação a ingesta hídrica, os dados obtidos em nosso estudo demonstram valores semelhantes aos encontrados pelo Canadian Council on Animal Care [6] e FIOCRUZ [15], no entanto diferente daqueles encontrados por Carvalho *et al.* [7] (29,4 mL/dia). De acordo com a literatura, um rato adulto, pesando cerca de 300g, consome diariamente uma média de 10 mL de água para cada 100 g de peso corpóreo. Contudo, o consumo pode variar de acordo com a temperatura e umidade ambiental, estado de saúde e vida sexual [5]. Isto pode justificar a maior ingesta hídrica encontrada em nosso estudo quando compara à de Carvalho *et al.* [7].

Tabela 2: Avaliação de parâmetros cardiovasculares e ingesta hídrica de ratos Wistar.

Varáveis Fisiológicas cardiovasculares	Unidade	N	Média	EPM
Pressão Arterial Sistólica (PAS)	mmHg	20	141,80	3,76
Pressão Arterial Diastólica (PAD)	mmHg	20	89,26	1,47
Pressão Arterial Média (PAM)	mmHg	20	106,77	1,39
Pressão de Pulso (PP)	mmHg	20	52,54	1,54
Frequência Cardíaca (FC)	bpm	20	344,3	4,07
Ingesta hídrica	mL/24	20	44,67	4,69

n = número de animais por parâmetro avaliado. Os resultados representam a Média ± Erro Padrão da Média (EPM) para cada parâmetro fisiológico avaliado.

A tabela 3 demonstra os resultados dos parâmetros morfológicos avaliados. Pode-se observar que tanto os índices de massa cardíaca quanto hepática estão de acordo com aqueles obtidos em outros estudos, a exemplo do de Matos *et al.* [11] e Dantas *et al.* [13].

Tabela 3: Avaliação de parâmetros morfológicos de ratos Wistar.

Varáveis Fisiológicas	Unidade	n	Média	EPM
Índice de massa cardíaca	g.100.g ⁻¹ de peso corporal	20	0,30	0,01
Índice de massa hepática	g.100.g ⁻¹ de peso corporal	20	3,20	0,07

n = número de animais por parâmetro avaliado. Os resultados representam a Média ± Erro Padrão da Média (EPM) para cada parâmetro morfológico avaliado.

A análise dos dados mostrou pequenas variações individuais quando cada parâmetro foi avaliado. No entanto, quando comparados os resultados do presente estudo com aqueles apresentados na literatura, ficou claro que alguns dados são semelhantes, enquanto outros são discordantes. Tal observação demonstra claramente que variações intra-espécies existem, sendo provavelmente resultantes de diferenças de ordem ambiental e metodológica. É imprescindível que essas variações sejam consideradas durante a pré-seleção dos animais, na avaliação e observação dos resultados obtidos nos procedimentos experimentais, assim como na análise das alterações produzidas por métodos de indução de patologias.

4. CONCLUSÃO

Os resultados desse estudo podem ser utilizados como padrão de homeostase de ratos machos Wistar criados no Biotério Central da UFS, permitindo aos pesquisadores identificar desvios de parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Sr. Osvaldo A. Santos pelo suporte técnico. Este trabalho foi desenvolvido com auxílio financeiro do CNPq, CAPES, FAPITEC-SE, Ministério da Saúde, SES/SE, Brasil.

- BRINCO, A.V. 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 Feevale, 2007. 40p.
- PINHEIRO, D.C.S.N.; FAVALI, C.B.F.; FILHO, A.A.S.; SILVA, A.C.M.; FILGUEIRAS, T.M. & LIMA, M.G.S. Parâmetros hematológicos de camundongos e ratos do biotério central da Universidade Federal do Ceará. *Bol Inf Cobeia*, São Paulo(3):6-9 (1997/98).
- GUIMARÃES, M.A.; MAZÁRO, R. Princípios éticos e Práticos do uso de Animais de Experimentação. São Paulo: UNIFESP (2004).
- CENTRO DE BIOTERISMO DA FMUSP. Parâmetros bioquímicos de ratos do centro de bioterismo da FMUSP, 2008. Disponível em: http://www.biot.fm.usp.br/index.php?mpg=03.00.00&tip=RATO&id_ani=17¶metros=sim. Acessado em 12/05/2010.
- HARKNESS, J.E. & WAGNER, J.E. Biologia e clínica de coelhos e roedores. 3ªed, Editora Roca, São Paulo (1993).
- CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE. Guide to the care and use of experimental animals. Vol 1, 2ª Ed, (1993), 298p.
- CARVALHO, G.D; MASSENO, A.P.B.; ZANINI, M.S.; ZANINI, S.F.; PORFÍRIO, L.C.; MACHADO, J.P. MAUAD, H. Avaliação clínica de ratos de laboratório (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar): parâmetros sanitários, biológicos e fisiológicos. *Revista CERES* 56(1):51-57 (2009).
- NANDHINI, A.T.A.; THIRUNAVUKKARASU, V.; ANURALHA, C.V. Stimulation of glucose utilization and inhibition of protein glycation and AGE products by taurine. *Acta Physiol. Scand.* 181:297-303 (2004).

9. RAJASEKAR, P.; ANURADHA, C.V. L-Carnitine inhibits protein glycation in vitro and in vivo: evidence for a role in diabetic management. *Acta Diabetol* 44:83-90 (2007).
10. ADENEYE, A.A.; AGBAJE, E.O. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of fresh leaf aqueous extract of *Cymbopogon citratus* Stapf. in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 112(3):440-444 (2007).
11. MATOS, S.L.; DE PAULA, H.; PEDROSA, M.L.; SANTOS, R.C.; OLIVEIRA, E.L.; CHIANCA-JÚNIOR, D.A.; SILVA, M.E. Dietary models for inducing hypercholesterolemia in rats. *Braz. Arch. Biol. Technol* 48(2):203-209 (2005).
12. RODRIGUES, E.R.; MORETI, D.L.C.; MARTINS, C.H.G.; KASAI, A.; STOPPA, M.A.; ALVES, E.G.; PAZ, K.; LOPES, R.A.; SALA, M.A.; PETENUSCI, S.O. Estudo de parâmetros bioquímicos em ratos sob ação de planta medicinal. [XI. *Chiococca Alba* (L.) Hitchc]. *Rev. Bras. Pl. Méd.* 8(4):169-172 (2006).
13. DANTAS, J.A.; AMBIEL, C.R.; CUMAN, R.K.N.; BARONI, S.; BERSANI-AMADO, C.A. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. *Revista Acta Sci Health Sci.* 28(2):165-170 (2006).
14. SOARES, D; MARTHENDALI, G.; ZIMMERMANN, M.C.; ZENI, A.L.B. Estudo dos níveis lipídicos em ratos após tratamento com infusão de algumas plantas medicinais de uso popular. *Rev Bras Farm*, 86(2):71-74 (2005).
15. FUNDAÇÃO OSVALDO CRUZ (FIOCRUZ). Curso de Manipulação de Animais de Laboratório. Salvador (2005).