

Análise hematológica de ratos *Wistar* para parâmetro de referência de grupos controle em pesquisa experimental.

Juliana Tomaz Sganzerla
Milene Castilhos de Oliveira
Silvany Niemeller Mayer
Maria Inês Witz
Mariangela da Costa Allgayer
Sergio Augusto Quevedo Miguens Jr

RESUMO

Objetivos: Realizar a análise hematológica de roedores, sem intervenção, para estabelecer um parâmetro de referência nos valores de hemograma de grupos controles utilizados em pesquisas experimentais. **Metodologia:** Avaliou-se os valores de hemograma, índices hematimétricos, plaquetas e proteína plasmática total de 40 animais (20 de cada sexo) *Rattus norvegicus* linhagem *Wistar*, provenientes do biotério da Universidade Luterana do Brasil, campus Canoas. Foram utilizados ratos adultos pesando entre 240g e 300g no momento da eutanásia. Os animais foram submetidos a jejum de três horas antes da coleta do sangue, através de punção cardíaca e as amostras foram analisadas pelo método automatizado. **Resultados:** Observou-se pequenas variações das médias entre os gêneros dos animais do nosso biotério. Contudo, os valores diferenciam por grupo de células brancas obtiveram as maiores diferenças de valores entre os estudos, principalmente a contagem de neutrófilos. **Conclusão:** Os resultados desse estudo podem ser utilizados como parâmetros para os valores de referência no grupo controle em comparação com os grupos de intervenção em pesquisas experimentais realizadas no mesmo biotério.

Palavras-chave: ratos wistar; valores de referência; contagem de células sanguíneas; hematologia; experimentação animal.

Juliana Tomaz Sganzerla - Doutoranda em Odontologia pela Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Campus Canoas/RS, Brasil.

Milene Castilhos de Oliveira - Professora Adjunta do Curso de Odontologia da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Campus Canoas/RS, Brasil.

Silvany Niemeller Mayer - Doutora em Odontologia pela Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Campus Canoas/RS, Brasil.

Maria Inês Witz e Mariangela da Costa Allgayer - Professora do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Campus Canoas/RS, Brasil.

Sergio Augusto Quevedo Miguens Jr - Professor do Programa de Pós-Graduação em Odontologia Curso de Odontologia, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Campus Canoas/RS, Brasil.

Autor Correspondente: Juliana Tomaz Sganzerla. Av. Farroupilha, 8001, prédio 59 (Odontologia), Bairro São José - CEP 92425-900 – Canoas, RS, Brasil - Fone (51) 999359088. Fax: (54) 3453.8928 E-mail: julianasganzerla.js@gmail.com

Conflitos de Interesse: Os autores declaram que não há conflitos de interesse.

Stomatos	Canoas	Vol. 26	Nº 50	p.21-29	Jan./Jun. 2020
----------	--------	---------	-------	---------	----------------

Hematological analysis of Wistar rats to reference parameter of control groups in experimental research

ABSTRACT

Objective: To carry out a hematological analysis of rodents, without intervention, in order to establish a reference parameter in the blood count values of control groups used in experimental research. **Methods:** Complete blood count, hematimetric indices, platelets and plasma protein values of 40 (20 of each sex) *Rattus norvegicus* animals, of the Wistar type, from the vivarium of the Lutheran University of Brazil, campus Canoas, were assessed. Adult rats weighing between 240 g and 300 g were used at the time of euthanasia. The animals were fasted three hours prior to blood collection through cardiac puncture, and the samples were analyzed using the automated method. **Results:** There were small variations in the means between the genera of the animals of the vivarium; however, if compared to the values obtained in other Brazilian vivaria, they had little variability or even no difference if the respective standard deviations are taken into account. However, the differential values by white cell group had the largest differences in values between the studies, especially in the neutrophil count. **Conclusion:** The results of this study can be used as parameters for the reference range in the control group as compared to intervention groups in experimental research carried out in the same vivarium.

Keywords: wistar rats; reference range; complete blood count; hematology; animal experimentation.

INTRODUÇÃO

O estudo em modelo animal tem sido amplamente utilizado para pesquisas em diversas áreas da saúde (1) sendo que os roedores são os mais utilizados por possuírem características fisiológicas e genéticas semelhantes à dos humanos (2).

No entanto, os valores de referência de exames hematólogicos de ratos são variadas e dependentes da metodologia empregada. Desta forma, isso influencia diretamente nos resultados laboratoriais e os resultados podem ser generalizados somente em condições específicas, como mesma linhagem de ratos, idade, dieta e metodologia de coleta de sangue e análise empregadas (3).

Os valores de referência da bioquímica do sangue em ratos não-tratados ou de grupos controle são dados de grande valor e podem ser utilizados como referência em diversos estudos, tais como os de avaliações de efeitos farmacológicos e toxicológicos. Com isso, o conhecimento dos valores dos diferentes parâmetros fisiológicos é critério significativo para a avaliação da homeostase e modificações induzidas por processos patológicos, além de permitir a avaliação e comparabilidade com os resultados de procedimentos experimentais (4).

A padronização do processamento e análise das amostras de sangue de cada biotério poderá minimizar a variabilidade e aumentar a validade externa dos resultados, podendo ser utilizados como parâmetro no grupo controle de amostras em outros estudos em modelo animal, que tenham as mesmas condições ambientais e características na comparação com

os grupos de intervenção. Para isso, é imprescindível que cada laboratório ou biotério estabeleça um conjunto próprio de valores de referência dos animais.

Ainda, considerada a regulamentação para o uso de animais em experimentação científica, a lei nº 11.794/08 (Lei Arouca), que estabelece procedimentos para o uso científico de animais (5), somado aos rigores e pareceres dos Comissões de Ética no Uso de Animais (CEAUs) das Instituições de ensino e pesquisa, que são regulamentados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), torna-se importante otimizar o uso de animais nos grupos controle em pesquisa experimental.

Destarte, no caso da análise hematológica e bioquímica do sangue, considerado os padrões de referência laboratoriais, por exemplo, dos valores de hemograma em humanos uma alternativa é estabelecer parâmetros de valores hematimétricos a serem utilizados como referência nos grupos controle em pesquisa experimental em modelo animal com uso de ratos da linhagem *Wistar*; que são comumente utilizados em odontológica para análise de biocompatibilidade de materiais, entre outros e, principalmente, pelo seu porte e quantidade disponível nos biotérios brasileiros. Desta forma, o presente estudo verificou o perfil hematológico de ratos adultos da linhagem *Wistar* sem intervenção com o objetivo de estabelecer um parâmetro de referência dos valores de hemograma e proteínas plasmáticas totais para grupos controle utilizados em pesquisa experimental em modelo animal.

MATERIAIS E MÉTODOS

A realização desta pesquisa, sob delineamento laboratorial em modelo animal, aprovada sob parecer nº 2014-10P da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Luterana do Brasil, campus Canoas, RS (CEAU-ULBRA) foi realizada no Biotério central da ULBRA.

Animais e Bioterismo

Foram utilizados 40 animais, sendo 20 de cada sexo, com número estabelecido a partir do cálculo amostral com base na diferença entre os sexos, *Rattus norvegicus* linhagem *Wistar* foram identificados com números nas caudas e separados conforme sexo e distribuídos de forma aleatória, em oito gaiolas com capacidade de até cinco animais e mantidas em estante ventilada com temperatura controlada (22°C) e ciclo claro-escuro de 12h. A maravalha foi trocada três vezes/semana e a ração (Nuvilab®) e água filtrada foram disponibilizadas *ad libitum*.

Os animais foram acompanhados por um veterinário do biotério durante o período de crescimento até atingir seis semanas de idade, considerada idade adulta, e pesando entre 240g a 300g na data da eutanásia que ocorreu conforme os preceitos estabelecidos pela CEUA-ULBRA (6) (Manual de Utilização de Animais de Experimentação CEUA ULBRA, 2015), quando foram submetidos a jejum de três horas e, após, coleta do sangue

realizada por punção cardíaca, com volume de aproximadamente 5ml e colocados em tubos de coleta padrão contendo anticoagulante EDTA sódico a 10%.

Parâmetros bioquímicos avaliados

Para análise do hemograma foram verificados os valores do eritrograma (série vermelha) pela contagem de hemácias/eritrócitos, hematócrito (Micro-Ht), hemoglobina (Hb), índices hematimétricos como, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e amplitude de distribuição das hemácias (ADA/RDW). O leucograma (série branca) foi analisado pela contagem total dos leucócitos e pela diferenciação celular na contagem de neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e linfócitos. Ainda, foram obtidas as contagens de plaquetas e proteína plasmática total (PPT) e, para cada parâmetro, foram expressos os valores da média e desvio padrão.

As amostras foram analisadas pelo método automatizado passando pelo processo de homogeneização (Homogeneizador de tubos Fanem, modelo 270T), por cinco minutos, e, após, pelo contador de células calibrado para espécie no analisador hematológico veterinário Poch-100i/V Diff (Roche), para dosagem da hemoglobina. A contagem de leucócitos foi realizada por esfregaços corados com panótico rápido (Newprov) e observados em microscópio óptico (Zeiss). A microscopia com aumento de 100x objetiva de imersão foi utilizada para contagem manual de células, diferenciação celular e obtenção do valor absoluto de cada célula da série branca. Os valores de PPT foram obtidos por refratometria.

RESULTADOS

Os valores hematológicos obtidos da amostra estão expressos na tabela 1. As médias dos parâmetros hematológicos por micro-hematócrito e por diferencial leucocitário dos ratos foram comparadas aos resultados de outros estudos que foram realizados em Biotérios de Instituições de Ensino e Pesquisa brasileiros (3,4,7,8) (Tabela 1).

Tabela 1: Distribuição dos parâmetros hematológicos e respectivos valores médios (\pm desvio padrão) obtidos das amostras de sangue de ratos adultos machos e fêmeas da linhagem *Wistar* do Biotério da ULBRA e de outros biotérios brasileiros.

Parâmetro (unidade)	Biotério Ulbra* (N=40)		Biotério PTG (3) (N=40)		Biotério UFPB (7) (N=10)		Biotério UFSE (4) (N=65)		Biotério UNIT (8) (N=88)	
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
Eritrócitos ($\times 10^9/\mu\text{L}$)	8,4 \pm 0,4	8,1 \pm 0,4	9,4 \pm 0,1	9,2 \pm 0,2	8,65 \pm 0,3	9,0 \pm 0,2	8,0 \pm 0,6	8,3 \pm 2,0	8,7 \pm 1,1	7,83 \pm 0,7
Hb (g/dL)	15,1 \pm 0,5	14,6 \pm 0,6	13,6 \pm 0,2	13,5 \pm 0,3	13,5 \pm 0,3	13,1 \pm 0,4	14,5 \pm 0,8	7,9 \pm 0,3	15,0 \pm 1,5	14,3 \pm 1,2
Micro-HT (%)	44,9 \pm 2,8	42,8 \pm 2,1	41,2 \pm 0,2	40,0 \pm 1,0	41,6 \pm 1,2	42,1 \pm 1,1	44,2 \pm 3,0	42,9 \pm 2,1	43,3 \pm 3,5	40,5 \pm 3,8
VCM (fL)	53,6 \pm 3,3	52,6 \pm 0,6	43,8 \pm 0,6	43,3 \pm 0,4	48,2 \pm 0,9	47,1 \pm 1,3	55,5 \pm 2,2	54,3 \pm 2,8	47,8 \pm 2,9	51,0 \pm 2,0
HCM (pg)	18,0 \pm 0,7	18,2 \pm 0,6	14,5 \pm 0,2	14,6 \pm 0,1	15,7 \pm 0,9	14,6 \pm 0,5	18,2 \pm 0,6	17,9 \pm 0,6	16,5 \pm 0,3	18,2 \pm 1,8
CHCM (g/dL)	33,7 \pm 1,6	34,6 \pm 1,3	33,1 \pm 0,3	33,6 \pm 0,2	32,4 \pm 0,4	31,1 \pm 0,2	32,8 \pm 1,1	33,1 \pm 1,1	34,9 \pm 2,4	35,8 \pm 3,9
RDW-CV (%)	11,5 \pm 2,1	12,0 \pm 1,5					15,9 \pm 1,7	14,8 \pm 1,2		
Leucócitos Totais ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	7,9 \pm 2,1	6,3 \pm 2,2	6,9 \pm 0,6	5,6 \pm 0,5	8,0 \pm 1,0	8,4 \pm 1,0	9,7 \pm 2,2	8,3 \pm 2,0	7,6 \pm 2,4	5,0 \pm 1,5
Neutrófilos (%)	15,6 \pm 5,5	21,5 \pm 7,2	21,8 \pm 1,6	19,6 \pm 1,8	8,7 \pm 2,6	19,7 \pm 3,5	24,8 \pm 7,8	22,3 \pm 6,7	33,1 \pm 15,0	24,0 \pm 14,5
Linfócitos (%)	83,7 \pm 5,4	76,2 \pm 8,0	73,1 \pm 1,6	74,5 \pm 2,0	79,2 \pm 2,7	78,3 \pm 3,8	70,0 \pm 7,4	71,7 \pm 7,2	67,4 \pm 15,3	73,9 \pm 16,3
Monócitos (%)	0,8 \pm 0,5	0,6 \pm 0,5	3,7 \pm 0,3	5,3 \pm 0,6	2,0 \pm 0,5	1,2 \pm 0,1	3,9 \pm 1,3	3,9 \pm 1,6	5,3 \pm 3,5	5,3 \pm 3,8
Eosinófilos (%)	1,0 \pm 0,5	1,9 \pm 1,6	0,8 \pm 0,2	0,6 \pm 0,2	0,1 \pm 0,1	0,7 \pm 0,8	1,3 \pm 0,8	1,42 \pm 0,7	1,2 \pm 1,1	0,6 \pm 0,6
Basófilos (%)	zero	zero							0,9 \pm 0,7	
Plaquetas (μL)	1.071 \pm 93,5	1.007 \pm 488,8	810 \pm 55	1030 \pm 55	658 \pm 19	638 \pm 42	1095 \pm 152	1004 \pm 151	982 \pm 167	971 \pm 140
PPT (g/dL)	6,7 \pm 0,4	6,9 \pm 0,5								

Legenda: M (macho); F (fêmea); Hb (hemoglobina); micro-HT (micro-hematócrito); VCM (volume corpuscular médio); HCM (hemoglobina corpuscular média); CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média); PPT (proteína plasmática total).

***Metodologias Biotério ULBRA:** PPT (refratometria); Hematócrito (micro-hematócrito); Eritrócitos, Hb, RDW e plaquetas (contagem eletrônica por Sysmex poch-H-100iV™ com verificação por microscopia óptica); Leucócitos Totais (contagem eletrônica por Sysmex poch-H-100iV™); Diferencial Leucocitário (Esfregaço sanguíneo, coloração rápida para hematologia (Panótico) e microscopia ótica 1000x).

DISCUSSÃO

A análise hematológica realizada obteve valores de hemograma, plaquetas e proteína plasmática total dos animais provenientes do Biotério central da ULBRA, os quais permitiram comparar com os valores relatados de outros estudos de biotérios de outras Instituições de pesquisas. E, tais resultados podem servir como valores ou padrão de referência para grupos controle de outros estudos que realizam comparação com grupos experimentais de outras pesquisas que utilizem este tipo de modelo animal.

Conforme a definição da Organização Mundial de Saúde (OMS), da Federação Internacional de Química Clínica (IFCC) e do Instituto de Padronização Clínica e Laboratorial (CLSI), o valor ou resultado de referência é um valor obtido pela observação ou mensuração quantitativa de um analito em um indivíduo selecionado, com base em critérios bem definidos (9). O que foi realizado no presente estudo, considerado os critérios como estabelecer o tamanho da amostra, a padronização dos procedimentos de bioterismo e o rigor nos procedimentos de coleta das amostras de sangue e do processamento e análise das amostras.

Os parâmetros hematológicos em modelo animal podem variar entre as linhagens e cepas diferentes de uma mesma espécie e também pelo método utilizado na coleta do sangue (10). Linhagens de animais de experimentação, quando padronizadas, atuam como ferramentas capazes de simular as complexas interações de órgãos e sistemas, possibilitando a compreensão *in vivo* dos eventos relacionados ao desenvolvimento da doença (11).

Os resultados verificados neste estudo mostraram pequenas variações entre os gêneros dos animais, entretanto ao compararmos os valores obtidos de outros biotérios (Diniz, 2006; Branco, 2011; Melo, 2012; Lima, 2014), verificamos que os valores médios se apresentaram bastante próximos entre os estudos. Os valores que apresentaram maior diferença podem, de forma geral, serem decorrentes de variáveis metodológicas como diferentes métodos de coleta de sangue, equipamentos e reagentes utilizados como, por exemplo, a utilização do método manual ou automatizado de análise. Outro fator a ser considerado é a ausência de padronização quanto à dieta, tempo de jejum e estresse dos animais no momento da coleta conforme relatado na literatura (Messias, 2009; Melo, 2012).

Dentre os parâmetros hematológicos avaliados a contagem de eritrócitos, tanto para machos como para fêmeas, apresentou valor médio de $8,4 \times 10^6/\mu\text{L}$ ($\pm 0,4$) e $8,1 \times 10^6/\mu\text{L}$ ($\pm 0,4$) respectivamente, os quais apresentaram valores médios com pouca variabilidade ou, ainda, sem diferenças quando analisado os seus respectivos desvios padrão de outros estudos. Da mesma forma, os valores de micro-hematócrito e hemoglobina respectivamente de 44,9% ($\pm 2,8$) e 15,1 g/dl ($\pm 0,5$) para machos e 42,8% ($\pm 2,1$) e 14,6g/dl ($\pm 0,6$) para fêmeas. Sendo estes dois últimos parâmetros, determinantes para avaliação da presença de anemia quando seus valores apresentam diminuição.

Na contagem de células da série branca, o número de leucócitos totais apresentou valores médios de $7,9 \times 10^3/\mu\text{L}$ (2,1) para machos e $6,3 \times 10^3/\mu\text{L}$ (2,2) para as fêmeas,

estando também em conformidade com os valores expressos nos outros estudos (3,4,7,8). Contudo, se analisarmos os valores diferenciais por grupo de células brancas, tanto das células envolvidas nos processos agudos da inflamação (neutrófilos, basófilos e eosinófilos) como dos processos crônicos (linfócitos e monócitos) entre os estudos, podemos verificar que as maiores diferenças ocorreram nestas contagens. Isso, talvez possa ser explicado pelo tipo de metodologia empregada na contagem diferencial das células, sendo o método de contagem por microscopia óptica com aumento de 1000x utilizado neste estudo, depende do exame visual que pode apresentar variabilidade e limitação na comparação entre os estudos.

A contagem de neutrófilos foi a que apresentou maior diferença com outros estudos. O que pode estar relacionado especificamente ao método utilizado de contagem, automatizado ou não. No método não automatizado a contagem é efetuada no esfregaço, onde existe uma distribuição irregular das células, diferentes tamanhos e aderência entre os diversos tipos de leucócitos, especialmente dos neutrófilos e monócitos que se concentram nas margens do esfregaço e podendo levar a erros de artefato de técnica. Além disso, na metodologia não automatizada são contadas entre 100 a 200 células por esfregaço, diferente do método automatizado que é em torno de 20.000 células, agrupadas e contadas através da passagem por uma micro-abertura gerando emissão de pulsos elétricos com posterior correção para a diluição utilizada e os leucócitos são diferenciados por coloração (3,10,12)

A contagem diferencial das células neste estudo por método não automatizado, mesmo sendo realizada por um patologista veterinário experiente, treinado e calibrado para o método, com a repetição da contagem de células com intervalo de 14 dias, apresentou limitação pois, se considerarmos que cada examinador pode seguir protocolos de contagem celular diferente ou, ainda, estar sujeito a erros de artefato de técnica do esfregaço, a contagem diferencial de glóbulos brancos pode ser considerada uma limitação para comparação dos estudos que utilizam o método não automatizado para a contagem diferencial de células brancas.

Os valores médios de PPT obtidos neste estudo não puderam ser comparados porque nenhum outro estudo verificado na literatura realizou análise deste parâmetro. Todavia, na comparação da contagem de plaquetas entre os estudos, foi observada diferenças principalmente com outros dois estudos (3,7) que apresentaram menores valores médios de plaquetas. Essas diferenças podem ser causadas por diversos fatores, entre eles, o estresse dos animais provocado pela manipulação que está relacionado aos efeitos negativos dos glicocorticóides liberados durante eventos estressores contínuos (13). Contudo, a variabilidade dos valores médios foi semelhante a outros dois estudos (4, 8).

A literatura sugere que parâmetros internacionais podem ser utilizados como referência na ausência de valores padronizados dos biotérios, entretanto, deve-se levar em consideração que o ambiente e a latitude geográfica do planeta influenciam nos valores de normalidade dos animais (14). Portanto, frente a análise dos resultados obtidos neste estudo, nos parece evidente que para garantir a confiabilidade dos experimentos devemos utilizar valores de referência padronizados para cada biotério, com animais

criados sob condições ideais e mantidos em ambientes controlados (15). Desta forma, podemos considerar que os valores de hemograma, contagem de plaquetas e PPT obtidos nesta amostra sem nenhum tipo de intervenção podem ser considerados como padrão de referência no grupo controle para comparação com os grupos de intervenção em pesquisa experimental com a utilização de ratos adultos *Wistar* com as mesmas características anatômicas, fisiológicas e condições ambientais.

CONCLUSÕES

Os resultados verificados na análise hematológica do presente estudo podem ser considerados como valores de referência para os grupos controle que utilizam amostra de sangue de ratos *Wistar* adultos de ambos os sexos na comparação com os outros grupos utilizados em pesquisa experimental realizadas em biotérios que mantenham as mesmas condições ambientais, afim da padronização dos valores de normalidade do hemograma, contagem de plaquetas e proteína plasmática total e otimização no uso de animais em pesquisa experimental.

AGRADECIMENTOS

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Almeida AS, 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., 2008;**44**(6):429-432.
2. Carvalho GD, Masseno APB, Zanini MS, Zanini SF, Porfírio LC, Machado JP, Mauad H. Avaliação clínica de ratos de laboratório (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar): parâmetros sanitários, biológicos e fisiológicos. Revista Ceres [Internet]. 2009 fevereiro [citado 2018 fevereiro 28];**56**:1:51-57.
3. Branco ACSC, Diniz MFFM, Almeida RN, Santos HB, Oliveira KM, Ramalho JA, Dantas JG. Parâmetros Bioquímicos e Hematológicos de Ratos Wistar e Camundongos Swiss do Biotério Professor Thomas George. Revista Brasileira de Ciências da Saúde. 2011;**15**(2):209-214.
4. Melo MGD, Dória GAA, Serafini MR, Araújo AAS. Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. Scientia Plena. 2012;**8**(4).
5. Miziara ID, Magalhães AT, Santos MD, Gomes EF, Oliveira RA. Research ethics in animal models. Braz J Otorhinolaryngol. 2012;**78**(2):128-31.

6. Universidade Luterana do Brasil. Manual de utilização de Animais de Experimentação. CEUA/ULBRA. 2015. Disponível em: [http://www.ulbra.br/ upload/bdadddf70b562aec5a244abd4dd749c0.pdf](http://www.ulbra.br/upload/bdadddf70b562aec5a244abd4dd749c0.pdf).
7. Diniz MFFM, Medeiros IA, Santos HB, Oliveira KM, Vasconcelos THC, Aguiar FB, Toscano MG, Ribeiro EAN. Padronização dos Parâmetros Hematológicos e Bioquímicos de Camundongos Swiss e Ratos Wistar. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*. 2006;**10**(2):171-176.
8. Lima CM, Lima AK, Melo MGD, Dória GAA, Leite BLS, Serafini MR, Albuquerque-Junior RLC, Araújo AAS. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. *Scientia Plena*. 2014;**10**(3).
9. NCCLS. How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline—Second Edition. NCCLS document C28-A2 (ISBN 1-56238-406-6). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA 2000.
10. Messias JB, Caraciolo MCM, Oliveira IM, Montarroyos UR, Guerra MO, Souza IA. “Parâmetros hematológicos de *Rattus norvegicus* obtidos através de métodos automatizado e não automatizado”. *Medicina Veterinária*. 2009;**3**(2):1–8.
11. Passos LAB. Análise do Determinismo Genético da Resistência de Camundongos Infectados Experimentalmente com a Cepa Y de *Trypanosoma Cruzi* [tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2003.
12. Nascimento MLP. Monócitos: os resultados da automação e amostras hospitalares. *Labor News*. 2002;**118**:24.
13. Tresguerres JAF, Kireen R, Tresguerres AF, Borrás C, Vara E, Ariznavarreta C. Molecular mechanisms involved in the hormonal prevention of aging in the rat. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 2008;**108**:318-126.
14. Dantas JA, Ambiel CR, Cuman RKN, Baroni S, Bersani-Amado CA. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. *Acta Scientiarum Health Science*. 2006;**28**(2):165-170.
15. Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. Animais de Laboratório: criação e experimentação. *FIOCRUZ*. 2002:387.