

Parte II – Protocolos e métodos de trabalho em doença de Chagas experimental

13. Sangria de animais e preparo de inóculos para infecção experimental

Tania C. Araújo-Jorge
Solange L. de Castro
(Orgs.)

SciELO Books / SciELO Livros / SciELO Libros

JORGE, TCA., and CASTRO, SL., orgs. *Doença de chagas: manual para experimentação animal* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2000. 368 p. Antropologia e Saúde collection. ISBN 85-85676-75-2. Available from SciELO Books <<http://books.scielo.org>>.

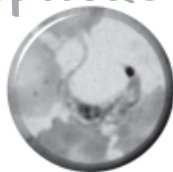


All the contents of this work, except where otherwise noted, is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 Unported.

Todo o conteúdo deste trabalho, exceto quando houver ressalva, é publicado sob a licença Creative Commons Atribuição - Uso Não Comercial - Partilha nos Mesmos Termos 3.0 Não adaptada.

Todo el contenido de esta obra, excepto donde se indique lo contrario, está bajo licencia de la licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 3.0 Unported.

Capítulo 13



Sangria de Animais e Preparo de Inóculos para Infecção Experimental

Tania C. Araújo-Jorge, Maria Teresa Rivera, Solange L. de Castro & Marcos Antônio P. Marques

13.1 Métodos de Sangria

Tanto para a análise hematológica dos animais antes da infecção (ver Capítulo 12) como para se obter o sangue que será usado no preparo do inóculo, pode-se proceder tanto por sangria total do animal infectado, por punção cardíaca, como por sangria parcial, pela cauda ou plexo orbital. O sangue deverá ser colhido em anticoagulante e diluído em solução salina fisiológica.

USAR LUVAS, MÁSCARA E GUARDA-PÓ DE MANGAS COMPRIDAS

13.1.1 Sangria pela cauda

Objetiva preparar lâmina para contagem de parasitemia, esfregaço para contagem leucocitária, medida do hematócrito e coleta de plasma.

Material

- caixa de contenção do animal
- tesoura de ponta fina e afiada
- algodão
- capilares heparinizados para microhematócrito e borracha de sucção do capilar
- massa plástica para vedação do capilar
- suporte plástico para capilar com marcação milimetrada
- lâminas de vidro para esfregaço sangüíneo
- fósforos
- tubos de microcentrífuga
- caneta de diamante
- centrífuga de microhematócrito
- caixas de descarte de material com as soluções desinfetantes apropriadas.

Procedimento

- identificar os capilares, as lâminas e os tubos que serão utilizados para o recolhimento de sangue dos diferentes camundongos;
- colocar o camundongo na caixa de contenção, com a cauda para fora;
- com uma das mãos, massagear a cauda no sentido da base para a ponta e segurar na ponta;
- com a tesoura na outra mão, cortar 1 mm ou menos da ponta da cauda;
- recolher uma gota para o preparo de esfregaço, que deve ser feito imediatamente por uma segunda pessoa. Caso seja feita a contagem de hemáceas ou leucócitos basta recolher uma gota do sangue sobre placa de Petri que será então utilizada para o procedimento de diluição e contagem;
- segurar a cauda do animal com as duas mãos e tornar a repetir o massageamento da base para a ponta, até aparecer nova gota, que será recolhida no capilar heparinizado (atenção: a ponta do capilar que contém a heparina geralmente é marcada com vermelho). Basta encostar a ponta heparinizada do capilar na cauda do animal e o sangue é transferido naturalmente para o seu interior;
- colocar o capilar horizontalmente sobre o suporte milimetrado e repetir o procedimento do item quinto acima (recolher uma gota para o preparo do esfregaço...) até encher o capilar do volume necessário (cada mm de capilar corresponde a 1 µl de sangue);
- ao final, colocar verticalmente o capilar sobre a massa plástica para vedá-lo;
- cauterizar a cauda do camundongo com fósforo;
- centrifugar o capilar em centrífuga de microhematócrito;
- ler o hematócrito contra régua própria ou régua simples de marcação milimetrada, caso o volume retirado seja menor que 70 µl de sangue;
- colocar o capilar sobre um suporte e riscar com a caneta diamante logo acima do creme leucocitário;
- quebrar o capilar em suas partes de plasma e células e transferir o plasma para um tubo de microcentrífuga, com o bulbo apropriado;
- congelar o plasma para análises posteriores.

No caso de trabalho com animais infectados, ao invés de vedar o capilar verte-se o sangue diretamente num tubo de microcentrífuga para a contagem de parasitas e o preparo da diluição do inóculo. Pode-se colher também diretamente o sangue no tubo de microcentrífuga, mas para que não coagule é necessário molhar a ponta da cauda com anticoagulante (heparina).

13.1.2 Sangria por punção do plexo orbital

Nos pequenos animais de laboratório a punção de uma veia é delicada, não permitindo a retirada de uma quantidade considerável de sangue e é difícil a sobrevivência do animal quando obtemos uma quantidade significativa de sangue. É preferível recorrer à técnica preconizada por Hoffmann, que consiste em punccionar o plexo orbital existente nos mamíferos, entre o glóbulo ocular e o fundo da cavidade orbitária.

Material

- tubos capilares heparinizados
- tubos de microcentrífuga
- colírio anestésico (cloridrato de proximetacaína 0,5%)

Procedimento

- a contenção do animal é realizada pela região cervical, de modo que automaticamente provoque uma estase venosa na região cefálica, provocando a exteriorização do glóbulo ocular;

- após a exteriorização do glóbulo ocular deve-se instilar uma pequena gota do colírio anestésico;
- introduzir o tubo capilar verticalmente entre o glóbulo ocular exposto e o fundo da cavidade orbitária;
- realizar uma ligeira pressão acompanhada de movimentos de rotação do tubo capilar;
Obs: assim que o plexo orbital é puncionado, o sangue preenche espontaneamente o tubo capilar. O relaxamento da pressão exercida sobre a região cervical, utilizada para conter o animal, faz cessar consideravelmente o fluxo sanguíneo.
- transferir o sangue recolhido para um tubo de microcentrífuga, previamente identificado.
Obs: a técnica de punção do plexo orbital pode ser novamente realizada 72 h após a primeira punção.

13.1.3 Sangria por punção cardíaca

Material

- placa de cortiça com quatro agulhas para fixação do animal
- câmara de anestesia (vidro de boca larga, com tampa, e algodão no fundo)
- éter etílico para anestesia
- tubos de microcentrífuga
- pissete com álcool
- seringas de 1 ml com agulhas de ponta fina e curta (13X4,5)
- anticoagulante (heparina ou citrato de sódio 3,8%)
- caixas de descarte de material com as soluções desinfetantes apropriadas

Procedimento

- colocar o camundongo infectado na câmara anestésica;
- preparar a seringa com anticoagulante enquanto o animal está sendo anestesiado: 0,1 ml de citrato de sódio 3,8% para cada 3 ml de sangue ou molhar a seringa com heparina;
- fixar o camundongo na placa, em posição de cruz;
- segurar a seringa com a mão direita (para dextros) e puncionar sobre o terceiro espaço intercostal (esquerdo) do camundongo;
- inserir a agulha de modo a perceber a perfuração da pele e do pericárdio;
Obs: o sangue jorrará assim que a agulha estiver dentro do ventrículo esquerdo do coração.
- aspirar lentamente com o embolo até completar 1 ml;
- retirar a seringa, descartar a agulha no recipiente apropriado e colocar o sangue no tubo de microcentrífuga;
- sacrificar o animal, caso não tenha ocorrido sua morte, através de overdose do anestésico ou por deslocamento cervical;
- descartar o animal em saco plástico mergulhando-o em formol 4%.

13.2 Inoculação

13.2.1 Escolha da via de inoculação

Diversas vias de inoculação podem ser usadas para a infecção por *Trypanosoma cruzi*, sendo mais comuns a subcutânea (SC) e a intraperitoneal (IP). Todas dão o mesmo resultado, com alguma diferença na cinética da parasitemia. A infecção também se transmite por inóculo via oral, mas não há muitos estudos comparando a resposta usando diferentes vias com diferentes modelos experimentais.

13.2.2 Cálculo e preparo do inóculo

Inóculo/animal

- mínimo: 10^2 (próximo ao fisiológico)
- médio: 10^3 a 10^4
- alto: 10^5 a 10^8

Material

- solução estoque de parasitas
- diluente: solução salina fisiológica (NaCl 0.85%), Alsever, etc.
- seringa de 1 ml

Preparo do inóculo intraperitoneal

Obs: recomenda-se dobrar o volume necessário para se trabalhar com folga.

Exemplo: para infecção de vinte animais com 10^4 /animal em 200 ml, necessita-se de 4 ml (vinte animais x 200 ml) (utilizar o dobro, 8 ml, como dito acima) de um inóculo na concentração de 5.10^4 /ml

- sendo, por exemplo, a solução estoque de parasitas = 40.10^5 parasitas/ml, deve-se diluir esta suspensão
- fórmula para diluição $V_1N_1 = V_2N_2$
- $\text{vol} \times 400.10^4 = 8 \times 5.10^4$
- $\text{vol} = 0,1$ ml
- preparo da diluição = 0,1 ml da sol. estoque de parasitas + 7,9 ml diluente

Obs: no caso de inoculação SC, os cálculos devem ser feitos para um volume de 100 ml, ou seja, 10^4 /animal em 100 ml, necessitando-se de 4 ml (utilizar o dobro 8 ml, como dito acima) de um inóculo na concentração de 10×10^4 /ml.

Referências Bibliográficas

- CARVALHO, W. F. *Técnicas Médicas de Hematologia e Imunohematologia*. 1983. Cooperativa Editora e de Cultura Médica, Ltda.
- GARCIA-NAVARRO, C. E. K. & PACHALY, J. R. *Manual de Hematologia Veterinária*. 1994. Editora Vanela.
- HOFFMANN, G. *Les animaux de laboratoire*. 1963. Paris: Vigot Frères.
- RULIER, J. & PARODI, A. *Laboratoire et diagnostic en Médecine Vétérinaire*. 1968. Paris: Vigot Frères.