

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Geral
Programa de Pós-Graduação em Genética



Dissertação de mestrado

Estudo do perfil genético de linhagens de camundongos mantidos nos biotérios de criação de duas instituições parceiras na Rede Mineira de Bioterismo.

Gabriel Barbosa de Oliveira

Orientação: Ana Lúcia Brunialti Godard

Belo Horizonte
2013

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Geral
Programa de Pós-Graduação em Genética

Gabriel Barbosa de Oliveira

Estudo do perfil genético de linhagens de camundongos mantidos nos biotérios de criação de duas instituições parceiras na Rede Mineira de Bioterismo.

Dissertação de mestrado apresentada
no programa de pós-graduação em
Genética da Universidade Federal de
Minas Gerais

Orientação: Ana Lúcia Brunialti Godard

**Belo Horizonte
2013**

Agradecimentos

Agradeço à “Força Maior” existente em todos nós, Deus.

À minha avó Mercês, que é também madrinha e mãe, por me acolher e acreditar em mim.

Agradeço aos meus pais, sem os quais eu não existiria.

Agradeço a minha querida esposa Ana Flávia, que sempre me apoiou e tornou-me forte nos momentos difíceis.

Agradeço aos meus filhos Miguel e Clara, por darem sentido à minha vida.

Agradeço à Doutora Ana Lúcia por me orientar e depositar confiança em meu trabalho.

Ao amigo/irmão/padrinho Érick e sua esposa Claudinéia sempre em alerta para ajudar.

Ao padrinho e irmão de coração Doutor Kinulpe, sua esposa Maria Elvira e filhos Vinícius e Felipe por servirem de inspiração e exemplo de alegria e ternura.

Agradeço aos amigos do biotério (Patrícia, Elmo, Gilmar, Mardem, Maria José, Alexandre e Wander) pela paciência e incentivo.

Aos companheiros do LGAH (Daniel, Shimene, Carol, Adriana, Aretta, Júlia, Patrícia, Angélica, Andrea e Bruno) pela convivência harmoniosa e sempre solícita.

Agradeço com carinho à minha aluna e agora colega de laboratório, Priscila Martins sempre muito gentil e amável e que tem um futuro brilhante pela frente.

Agradeço à Doutora Adriana Abalen pelas dicas sempre úteis e instigantes.

Agradeço à Doutora Vera Peters que disponibilizou as amostras do CBR.

Aos amigos da FUNED, em especial à Elizangela que sacrificou alguns finais de semana para me ajudar.

Aos colegas do LGM (Edmar Chartone, Andrea Amaral, Mônica, Adlane, Paulo, Clarice, Monalisa e Paixão) por permitirem a utilização do laboratório aos finais de semana e feriados.

Agradeço a colega Marlene que com muita simpatia e carisma sempre me incentivou.

À querida Bozena Kowalski que apesar dos 14000 quilômetros de distância muito me ajudou com a leitura de artigos.

A todos demais amigos do ICB/UFMG, CBR/UFJF e CEMIB/Unicamp, que direta ou indiretamente, tornaram possível a realização deste trabalho, meu muito obrigado.

Sumário

Lista de Abreviaturas.....	6
Resumo.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 O USO DE ANIMAIS NA PESQUISA CIENTÍFICA.....	13
1.2 O CAMUNDONGO.....	14
1.3 A ESTRUTURA GENÉTICA DAS POPULAÇÕES ENDOGÂMICAS E A DERIVA GENÉTICA.....	20
1.4 BIOTERISMO: CONCEITOS E IMPORTÂNCIA.....	21
1.5 CONTROLE GENÉTICO DAS LINHAGENS DE ANIMAIS MANTIDAS NO BIOTÉRIO.....	22
1.6 MARCADORES GENÉTICOS.....	24
1.7 A REDE MINEIRA DE BIOTERISMO.....	25
2. JUSTIFICATIVA.....	27
3. OBJETIVOS.....	28
3.1 Objetivos Gerais.....	28
3.2 Objetivos específicos.....	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
4.1 LEVANTAMENTO DE DADOS.....	29
4.2 COLETA DO MATERIAL.....	29
4.3 EXTRAÇÃO DE DNA.....	30
4.4 TESTE DE MARCADORES POLIMÓRFICOS ENTRE AS LINHAGENS.....	30
4.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	33
4.6 ANÁLISES DE POLIMORFISMOS.....	34
5.RESULTADOS.....	36
6. DISCUSSÃO.....	46
7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	49
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre.”

Paulo Freire

Lista de Abreviaturas

cM – centimorgan

CPqRR – Centro de Pesquisas René Rachou

CEMIB/UNICAMP – Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na área da ciência de animais de laboratório da Universidade Estadual de Campinas.

DNA – ácido desoxirribonucléico

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

ENU- N-etil-N-nitrosourea

FAPEMIG - Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais

FUNED – Fundação Ezequiel Dias

IRR – Instituto René Rachou

Kb - quilobases

LGAH – Laboratório de Genética Animal e Humana

MHC - Major Histocompatibility Complex

Mpb – megabases

MGI – Mouse Genoma Informatics

NCBI – National Center for Biotechnology Information

pb – par de base

PCR – reação em cadeia da polimerase

RFLP - polimorfismos de comprimento de fragmento de restrição

RMBioterismo – Rede Mineira de Bioterismo

SNP – polimorfismo de nucleotídeo único

UFJF – Universidade Federal de Juiz de Fora

UFLA – Universidade Federal de Lavras

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UFOP – Universidade Federal de Ouro Preto

UFSJ – Universidade Federal de São João Del rei

UFV – Universidade Federal de Viçosa

Lista de Figuras

Figura 1. Percentual de animais utilizados em pesquisas científicas..	15
Figura 2. Relações evolutivas entre os modelos mais utilizados em laboratório.	17
Figura 3. Esquema de cruzamento para formação e manutenção de linhagens isogênicas.	18
Figura 4. Método Poiley para formação de colônias <i>outbred</i>	19
Figura 5. Estratificação de colônias de roedores em um biotério de criação..	21
Figura 6. Mapa cromossômico exibindo a posição dos 60 marcadores microsatélites utilizados na genotipagem por PCR.	31
Figura 7. Eletroforese de produtos de PCR para alguns dos marcadores microsatélites utilizados na genotipagem da linhagem C57BL/6 presente no biotério da UFMG.	37
Figura 8. Taxa de marcadores em heterozigose para as linhagens de camundongos BALB/c e C57BL/6 mantidos nos biotérios de produção da UFMG e UFJF.	39
Figura 9. Exemplo de um mapa genético de camundongos isogênicos..	47

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Avanço da medicina decorrente de pesquisas com animais.	13
Tabela 2. Principais dados biológicos e fisiológicos do camundongo.	16
Tabela 3. Lista dos marcadores microssatélites.....	32
Tabela 4 – Protocolo para reação de PCR.....	33
Tabela 5. Temperatura de anelamento utilizada para cada par de iniciadores.	34
Tabela 6. Informações sobre os biotérios da RMBioterismo, novembro de 2011.	366
Tabela 7. Marcadores que apresentaram heterozigose na genotipagem dos camundongos do biotério de produção da UFMG e da UFJF.	38
Tabela 8. Número de animais em heterozigose por marcador microssatélite testado para as linhagens de camundongos isogênicos BALB/c e C57BL/6 mantidas nos biotérios de produção da UFMG e da UFJF.....	40
Tabela 9. Número de amostras em heterozigose em mais de um marcador microssatélite testado para as linhagens de camundongos isogênicos mantidos nos biotérios de produção da UFMG e UFJF.	40
Tabela 10. Comparação do tamanho dos produtos amplificados (pb) para os marcadores microssatélites com as informações contidas no banco de dados MGI para as linhagens isogênicas de camundongo BALB/c mantida no biotério de produção da UFMG.	42

Tabela 11. Comparação do tamanho dos produtos amplificados (pb) para os marcadores microssatélites com as informações contidas no banco de dados MGI para as linhagens isogênicas de camundongo BALB/c mantida no biotério de produção da UFJF..... 43

Tabela 12. Comparação do tamanho dos produtos amplificados (pb) para os marcadores microssatélites com as informações contidas no banco de dados MGI para as linhagens isogênicas de camundongo C57BL/6 mantida no biotério de produção da UFMG..... 44

Tabela 13. Comparação do tamanho dos produtos amplificados (pb) para os marcadores microssatélites com as informações contidas no banco de dados MGI para as linhagens isogênicas de camundongo C57BL/6 mantida no biotério de produção da UFJF..... 45

Resumo

O controle genético é essencial na administração de colônias de linhagens isogênicas uma vez que a contaminação genética destas linhagens passou a comprometer os resultados experimentais em ciências de animais de laboratório, tornando-se um problema sério entre a comunidade científica.

A contaminação entre linhagens da mesma cor bem como divergências genéticas devido à deriva genética podem levar a prejuízos, como perda de recursos investidos em pesquisa, além de desperdício de tempo e dados incorretos na experimentação. Essas diferenças genéticas podem influenciar testes farmacológicos e respostas de comportamento, podendo permanecer inadvertidos por um longo período sem que o pesquisador perceba que os dados do seu trabalho estão comprometidos devido à alteração do background genético do animal utilizado. Por isso, o monitoramento genético é um fator importante a ser considerado e deve fazer parte da rotina de um biotério de produção.

Este trabalho objetivou estudar o perfil genético dos camundongos isogênicos mantidos em dois biotérios da Rede Mineira de Bioterismo, formada por oito instituições no Estado de Minas Gerais. Amostras das linhagens de camundongos isogênicos BALB/c e C57BL/6 foram coletadas das colônias de fundação dos biotérios de produção da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e do Centro de Biologia da Reprodução (CBR), na Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). As amostras foram genotipadas utilizando-se 60 marcadores microssatélites polimórficos para as duas linhagens (BALB/c e C57BL/6). Foram selecionados três marcadores por cromossomo perfazendo os 19 autossômicos e o cromossomo X. Os produtos de PCR foram analisados após eletroforese em gel de agarose e comparados com os valores de referência disponíveis no banco de dados MGI.

Observou-se heterozigosidade em ambas as linhagens mantidas no biotério da UFMG, cerca de 8% dos marcadores testados para a linhagem BALB/c e 3% para a linhagem C57BL/6. No biotério de produção da UFJF não foram observadas heterozigosas para as linhagens isogênicas BALB/c e C57BL/6. Estes resultados sugerem a ocorrência de deriva genética com formação de sublinhagens no biotério da UFMG, devido ao longo período de permanência, sem renovação, das mesmas. Estas informações servirão de base para elaboração de rotinas de controle genético no novo biotério da UFMG, que iniciará suas atividades com novas colônias de animais em maio

deste ano, além de servir para intercâmbio de informações entre os biotérios da Rede Mineira de Bioterismo.

Abstract

Genetic control is essential in managing colonies of inbred strains as genetic contamination of these lineages began to compromise the experimental results in laboratory animal science, becoming a serious problem among the scientific community.

Contamination between strains of the same color and genetic differences due to genetic drift can bring an economic loss, such as loss of resources invested in research, and wasted time and incorrect data in experiments. These genetic differences can greatly influence testing pharmacological and behavioral responses, and may remain unnoticed for a long period without the researcher to note that data from his work are compromised due to changing the genetic background of the animal used. Therefore, the genetic monitoring is an important factor to be considered and should be part of routine production of a animal facility.

This study investigated the genetic profile of inbred mice kept in two Animal Facilities of Rede Mineira de Bioterismo, comprised of eight institutions in the State of Minas Gerais. Samples of inbred mouse strains BALB/c and C57BL/6 were collected from foundation colonies of animal facility production of Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) and the Center for Biology of Reproduction (CBR) at the Federal University of Juiz de Fora (UFJF). Samples were genotyped using polymorphic microsatellite markers 60 for both strains (BALB/c and C57BL/6). We selected three markers on chromosome making the 19 autosomal and X chromosome. The PCR products were analyzed after electrophoresis on agarose gel and compared to reference values available in the database MGI.

Heterozygosity was observed in both strains maintained in the UFMG Animal Facility. About 8% of the markers tested for strain BALB/c and 3% for the C57BL/6 strain. In Animal Facility production UFJF were not observed heterozygosity for the inbred strains BALB / c and C57BL / 6. These results suggest the occurrence of genetic drift with the formation of sublineages on UFMG Animal Facility, due to the long stay period without renewal of the same. This information will provide the basis for development of genetic control routines in the new Animal Facility UFMG, which will start its activities with new colonies of animals in May this year, besides serving for exchange of information between Rede Mineira de Bioterismo.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O USO DE ANIMAIS NA PESQUISA CIENTÍFICA.

A ciência é uma das formas de o homem compreender o universo e mudar drasticamente o modo que vivemos. A metodologia científica está no âmago do pensamento científico e apesar de ser dinâmica, mantém as sólidas bases que inclui as etapas de observação, questionamentos, formulação de hipóteses, experimentação, análises e conclusões (Oliveira *et al.*, 2010).

A experimentação permite aceitar ou refutar as hipóteses previamente formuladas, sendo a melhor forma de responder às perguntas inerentes ao processo científico. Nas áreas das ciências da saúde uma parcela significativa dos experimentos requer a utilização de animais, humanos ou não humanos, pois uma infinidade de reações metabólicas, importantes para o entendimento do processo saúde-doença, é impraticável *in vitro* (Oliveira *et al.*, 2010).

A utilização de animais não humanos em pesquisa é fundamental ao avanço da ciência uma vez que, por limitações éticas, nem sempre é possível a realização de estudos em humanos. É fato que estudos com animais geraram descobertas de enorme impacto nas condições de vida e longevidade do ser humano (Oliveira *et al.*, 2010). Ao longo da história, pesquisas envolvendo câncer, produção de vacinas, doenças cardiovasculares, transplantes de órgãos, descoberta de medicamentos, entre outros não seriam possíveis sem a ciência de animais de laboratório, tabela 1.

TABELA 1 – Avanço da medicina decorrente de pesquisas com animais.

Ano	Descoberta	Tipo de animal
1796	Vacina da varíola	Vaca
1885	Vacina da raiva	Cachorro e coelho
1905	Patogênese da tuberculose	Vaca e ovelha
1919	Mecanismos da imunidade	Porco-da-india, cavalo e coelho
1921	insulina	Cachorro e peixe
1945	Teste da penicilina	Camundongo
1954	Vacina da poliomielite	Camundongo e macaco
1968	Vacina da Rubéola	Macaco
1984	Anticorpos monoclonais	Camundongo
1990	Transplante de órgãos	Cachorro, ovelha, vaca e porco
2002	Mecanismos de morte celular	Verme
2007	Modificação genética em célula-tronco embrionárias	Camundongo

(Oliveira *et al.*, 2010).

Há muitos séculos os animais vêm sendo utilizados em experimentos. Inicialmente, trabalhos de anatomia e fisiologia envolviam a dissecação para análise das funções corporais. Com o tempo, a utilização de animais não humanos em pesquisa aumentou significativamente sob a influência de pensadores como o filósofo utilitarista inglês Jeremy Bentham (1748-1832) que conduziu esta ascensão acompanhada de uma evolução do ponto de vista ético, permitindo significativos avanços científicos, especialmente em medicina e fisiologia (Simmons, 2004).

É notório que a pesquisa com animais de laboratório também gerou muitos benefícios para os próprios animais, além do homem. A medicina veterinária vivencia avanços com melhorias na qualidade de vida dos animais, aumento da longevidade graças a imunizações; uso de fármacos e procedimentos cirúrgicos, além de processos reprodutivos que podem auxiliar na proteção de espécies ameaçadas de extinção (Oliveira *et al.*, 2010).

Atualmente, os roedores, especialmente ratos e camundongos, são os animais mais utilizados em pesquisas que envolvam o uso de animais, servindo de ferramentas para responder a perguntas específicas sobre doenças humanas (Guénet, 2011).

Nos últimos anos vivenciamos a evolução dos princípios éticos quanto à utilização de animais na ciência. Pesquisas sobre métodos alternativos que possam substituir de forma fidedigna o uso de animais são realidades de grandes centros de pesquisa em todo o mundo, além de legislações específicas que resguardam os animais de abusos garantindo o bem estar animal e redução do sofrimento (Rivera, 2002).

1.2 O CAMUNDONGO.

Uma das questões fundamentais da metodologia científica é a reprodutibilidade dos resultados experimentais. Dessa premissa nasceu a necessidade de se estabelecer, em ciência de animais de laboratório, o conceito de modelo animal, que seria aquele animal que melhor responderia ao experimento e possibilitaria a sua reprodução, de maneira que qualquer pesquisador pudesse ter acesso aos mesmos resultados (Santos, 2002).

O camundongo tornou-se um importante modelo experimental para os estudos genéticos desde o início do século XX, juntamente com a redescoberta dos trabalhos de Mendel. Este animal pertence à ordem Rodentia que representa 43,5% das cinco mil espécies atualmente descritas nas 12 ordens de mamíferos (Chorilli, *et al.*, 2007).

O nome da ordem é proveniente do latim *rodere*, que significa roer. Os roedores, portanto caracterizam-se por possuírem um mecanismo especial de mastigação, baseado na ação de roer, o que conseguem graças a dois pares de poderosos dentes incisivos e a um sistema muscular mandibular altamente especializado (McDonald, 1999).

Na classificação mais aceita atualmente, o camundongo está inserido na família Muridae, gênero *Mus*, espécie *Mus musculus*. As relações filogenéticas entre as diferentes espécies dessa família foram um assunto de controvérsia por muito tempo, especialmente quando marcadores morfológicos eram os únicos critérios disponíveis para estabelecer a filogenia. Mais recentemente, tendo à disposição vários marcadores moleculares, especialmente de DNA, e referências disponíveis da sequência genômica completa de numerosos genes ortólogos (homólogos de sistemas biológicos diferentes), a situação está muito mais transparente, mostrando que os camundongos do complexo *Mus musculus* são intimamente aparentados. Eles possuem suas origens evolutivas na Índia, mas estão agora espalhados em todos os continentes (Ko, *et al.*, 2009).

O camundongo é, atualmente, o modelo animal mais utilizado na pesquisa (Figura 1). Várias características tornam este pequeno animal um aliado das ciências da saúde. São pequenos, dóceis e de fácil manejo, além de serem muito prolíficos e possuírem curto período de gestação (Guénet, 2003).

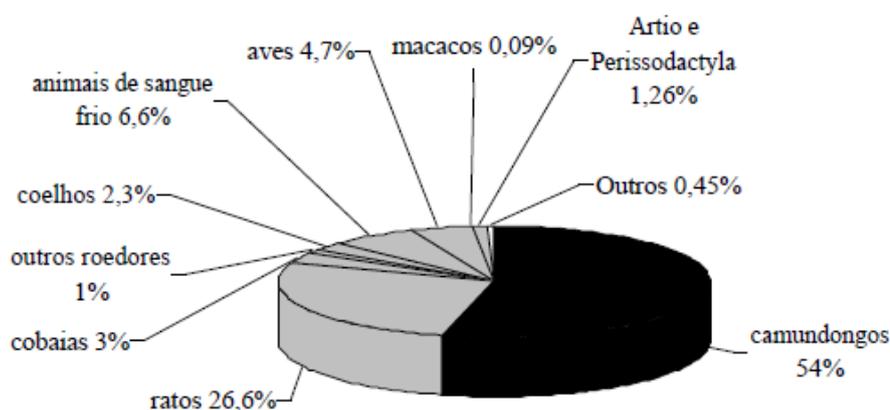


Figura 1. Percentual de animais utilizados em pesquisas científicas. CEC, 2005.

É importante salientar, no entanto, que devido ao seu tamanho pequeno, o camundongo é extremamente susceptível a mudanças nas condições ambientais. A temperatura corpórea deste animal, por exemplo, é facilmente afetada pelas pequenas

alterações na temperatura ambiental, que pode modificar suas respostas fisiológicas. A tabela 2 apresenta os principais dados biológicos e fisiológicos dos camundongos.

Tabela 2. Principais dados biológicos e fisiológicos do camundongo.

Temperatura ambiente ideal	21-22 ⁰ C ($\pm 2^0$)
Umidade (UR)	50-55%
Consumo de ração/dia/adulto	5 g
Consumo de água/dia/adulto	6 mL
Puberdade	42 dias de idade
Peso na puberdade	20-25 g
Maturidade sexual	60 dias
Ciclo estral	4-5 dias
Período de gestação	19-21 dias
Aleitamento	19-21 dias
Vida reprodutiva	Macho: 1 ano Fêmea: 6-8 partos
Tamanho da ninhada	10-12 filhotes (<i>outbred</i>)
Peso ao nascer	1-2 g
Idade para desmame	21 dias
Peso ao desmame	10-12 g

www.reitoria.ufsc.br/prpg/bioterio

Há grande homologia genotípica e semelhanças fisiológicas entre homem e camundongo quando comparado a outros modelos animais como *Xenopus*, *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans*, pois a divergência evolutiva entre homem e camundongo é muito mais recente quando comparada a estes últimos, como é ilustrada na figura 2. Somando-se ao fato de o genoma murino ser o segundo mais estudado entre os mamíferos, perdendo apenas para o humano, a escolha deste animal como modelo é uma estratégia muito bem sucedida (Godard, 2008).

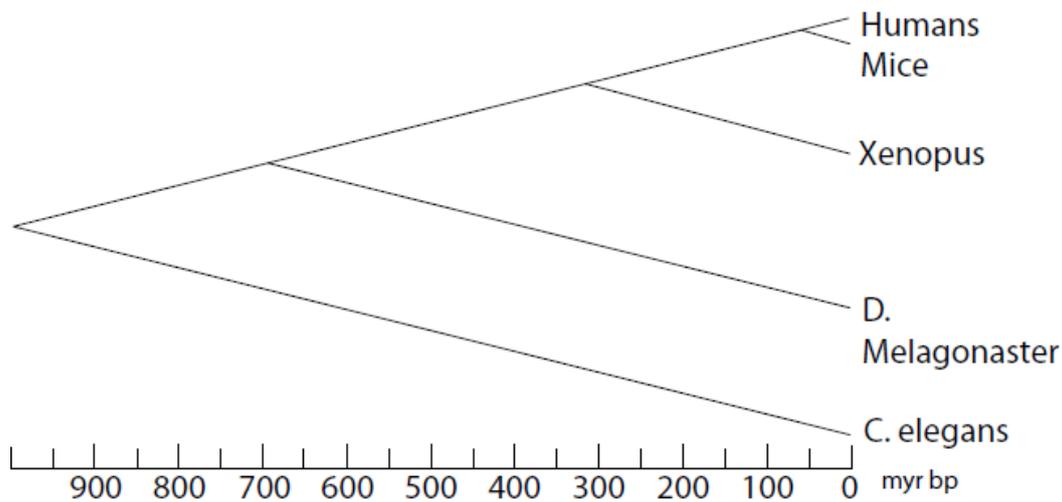


Figura 2. Relações evolutivas entre os modelos mais utilizados em laboratório. Os tempos aproximados em divergências evolutivas entre os organismos citados e seus ancestrais comuns estão indicados ao longo da linha do tempo, em uma escala de milhões de anos. Destaque para a divergência recente entre camundongos e humanos, há cerca de 60 milhões de anos. (Silver, 1995)

Quanto à classificação genética das linhagens de camundongos podemos dividi-los em linhagens que resultam de acasalamentos entre irmãos (*inbred*), são chamados de isogênicos, enquanto colônias provenientes de acasalamentos ao acaso (*outbred*), são ditos heterogênicos (Massinori, 2009).

O camundongo isogênico é obtido por acasalamento mínimo de 20 gerações consanguíneas a partir de um único casal, resultando em coeficiente de endogamia de 98,6%. A figura 3 ilustra a série sequencial de acasalamentos entre irmãos que são escolhidos de acordo com os índices biológicos de maior produtividade. As principais características das linhagens isogênicas são: isogenicidade, homozigose, uniformidade fenotípica e estabilidade genética em longo prazo. Estes animais tem grande valor, pois permitem a realização de experimentos eliminando a variabilidade de origem genética, permitindo assim a utilização de um número menor de animais para que seja alcançado o poder estatístico necessário (Casellas, 2010). Cada linhagem consanguínea representa um conjunto único de gene, pois o acasalamento consanguíneo diminui a frequência de genótipos heterozigotos, gerando um estado homoalélico, ou seja, onde há uma só variante alélica presente que leva à fixação dos alelos desse grupo (Braga, 2010). Atualmente, mais de 90% dos trabalhos científicos publicados em todas as áreas usam linhagens isogênicas (Massinori, 2009).

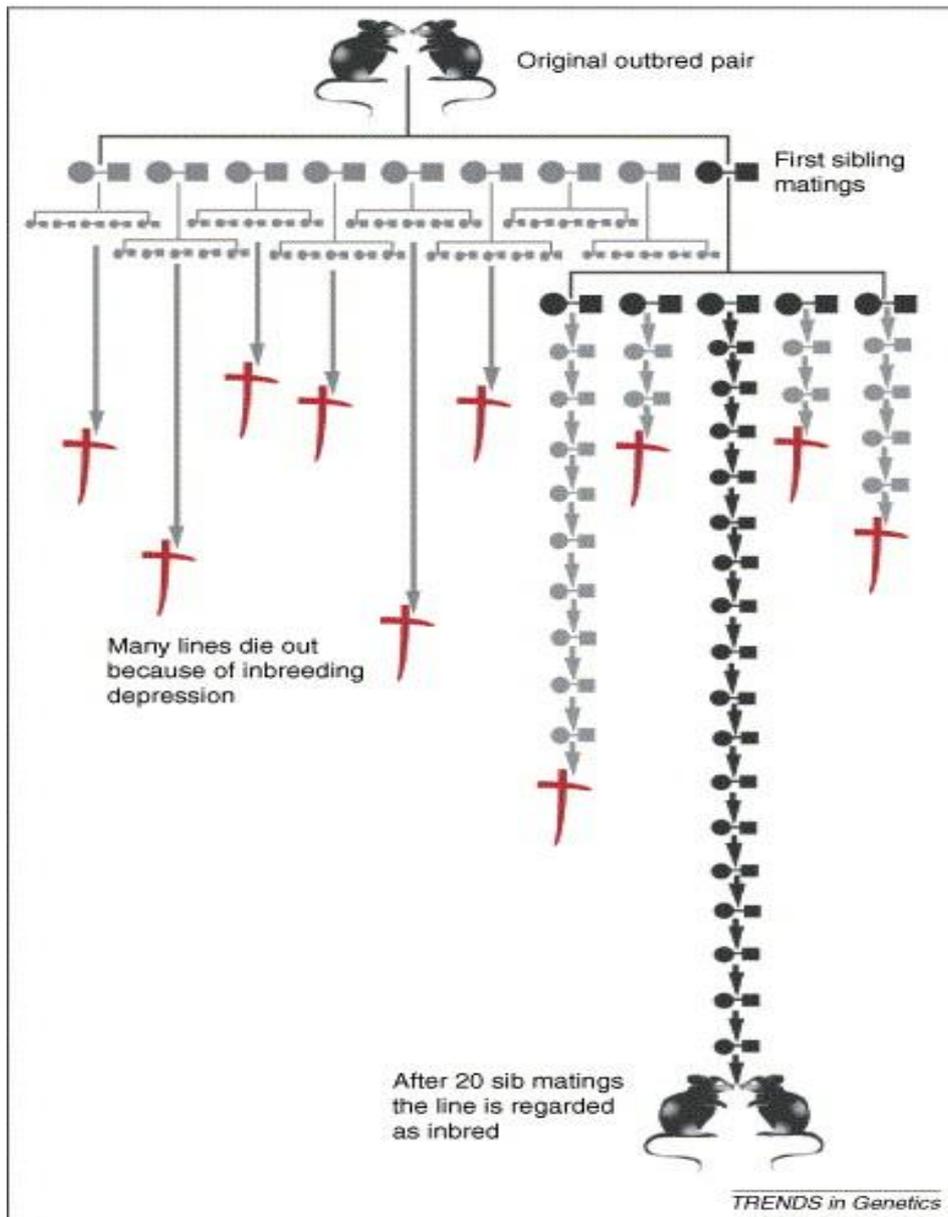


Figura 3. Esquema de cruzamento para formação e manutenção de linhagens isogênicas (Taft, *et al.*, 2006).

Vários prêmios Nobel têm sido concedidos a trabalhos que, provavelmente, não poderiam ser realizados sem linhagens isogênicas. Por exemplo, o uso de linhagens isogênicas contribuiu para o trabalho vencedor do prêmio Nobel de George Snell na elucidação da biologia do MHC do camundongo. Muitas linhagens isogênicas são criadas para fenótipos específicos. A linhagem C57BL/6, por exemplo, tem um aumento na preferência por álcool e narcóticos, o que torna seu uso em estudos de genética uma boa ferramenta para avaliar a preferência por estas substâncias (Massironi, *et al.* 2006). Outro exemplo interessante é a sensibilidade de camundongos BALB/c e C3H por

mutagênicos como Etil Nitrosureia (ENU) que tem sido valioso em estudos de mutagênese (Beck, 2000; Massironi, 2006).

Os camundongos cruzados aleatoriamente, denominados *outbred*, formam lotes de camundongos não definidos geneticamente, estas colônias são mais fáceis de criar em função do vigor híbrido, apresentando frequência de acasalamentos produtivos próxima a 100% (Massironi, 2009). As colônias de camundongos *outbred* são úteis, por exemplo, em pesquisas nas quais o genótipo do animal não precisa ser conhecido. Uma das colônias de camundongos *outbred* mais utilizadas é a Swiss (Massironi, 2009).

O cruzamento de colônias *outbred* deve seguir esquemas que evitem o cruzamento de indivíduos aparentados, como o método Poiley, figura 4.

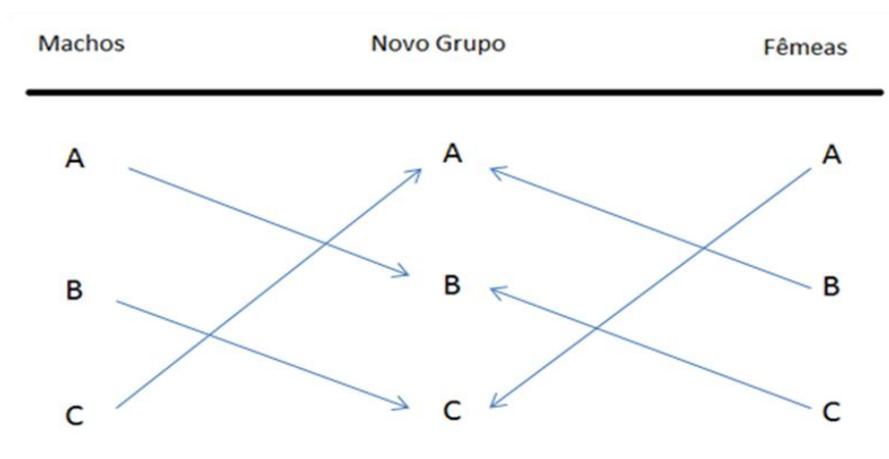


Figura 4. Método Poiley para formação de colônias *outbred*. A formação do novo grupo A será feita com machos do grupo C e fêmeas do grupo B; o novo grupo B será formado com machos de A e fêmeas de C e o novo grupo C será formado por machos de B e fêmeas de A (Ebisui, *et al*, 2009).

Por muito tempo os animais de laboratório foram utilizados como simples instrumentos de trabalho, úteis na investigação diagnóstica e diferentes pesquisas, porém não era levada em conta sua qualidade genética e sanitária. Os institutos de pesquisa não possuíam estruturas adequadas bem como pessoal habilitado para desenvolver atividades relacionadas à ciência de animais de laboratório (Andrade, 2006).

Atualmente há exigências para que animais de laboratório sejam produzidos sob condições ideais e mantidos em um ambiente controlado, com conhecimento e acompanhamento microbiológico e genético seguros, obtidos por monitoração regular. Nesta perspectiva, o bioterismo assume um papel de suma importância para a pesquisa

com animais de laboratório, pois busca a produção de animais com a qualidade que satisfaça os requisitos para o uso nas pesquisas médicas (Agca, 2012).

1.3 A ESTRUTURA GENÉTICA DAS POPULAÇÕES ENDOGÂMICAS E A DERIVA GENÉTICA.

A frequência de heterozigotos é reduzida nas espécies autofecundantes, se comparada à das espécies estritamente exocruzantes (Hedrick, 1983). Para a maioria das espécies exogâmicas, a consanguinidade é prejudicial porque diminui a proporção de homozigotos e, portanto aumenta a probabilidade de que alelos deletérios e letais recessivos se combinem para produzir homozigotos com uma característica prejudicial. Esse aumento de características letais e deletérias com a endogamia é chamado de depressão de endogamia; quanto mais intensa a endogamia, mais grave a depressão de endogamia (Hartl, et al. 1997).

O fenômeno da depressão endogâmica leva a reduções nas taxas de fecundidade e de viabilidade à medida que a população se torna mais endogâmica (MacIntyre, 1985).

A despeito do fato de que a endogamia é geralmente prejudicial para espécies exogâmicas, várias plantas e animais regularmente endocruzados são bem-sucedidos. A endogamia é comumente usada para produzir organismos com características desejáveis. Como a endogamia aumenta a homozigose, todos os indivíduos na população acabam por se tornar homozigotos para o mesmo alelo. Se uma espécie sofre endogamia por várias gerações, muitos alelos recessivos deletérios são eliminados pela seleção natural, de modo que a população se torna homozigota para os alelos benéficos. Desse modo, os efeitos prejudiciais da endogamia podem acabar sendo eliminados, deixando uma população que é homozigota para características benéficas (Hedrick, 1983).

As cópias gênicas presentes em uma população são apenas uma amostra dos genes existentes na geração precedente, uma vez que alguns dos seus genes, por acaso, não foram transmitidos para quaisquer dos descendentes sobreviventes. Os genes da geração paterna, do mesmo modo, formam apenas uma amostra daqueles presentes na geração anterior e esses, por sua vez, devem ter sido retirados de uma amostra numericamente maior dos genes que estavam presentes no passado distante. Assim, um ou outro alelo tem sua frequência aumentada, ou seja, o alelo representado pela cópia gênica original que, por acaso, deixou o maior número de descendentes nas gerações

subsequentes terá sua frequência alterada. Uma vez que apenas o acaso determina qual gene estará presente em maior número de cópias nos descendentes, o alelo que predominará em uma população diferente (mas inicialmente idêntica) pode não ser o mesmo alelo (Hedrick, 1983)

Esse processo de mudança aleatória na frequência gênica é denominado deriva genética. À medida que a deriva genética ocorre, a variação entre as populações aumenta de geração a geração. O processo de deriva genética pode ser encarado como uma flutuação aleatória na frequência alélica, levando, eventualmente, à fixação ou à perda de alelos e divergência genética entre populações (Futuyma, 1986).

Apesar das colônias de roedores de laboratório suportarem relativamente bem um regime de cruzamentos consanguíneos levando à formação de linhagens isogênicas (Godard, *et al.* 1999), a separação de colônias de camundongos isogênicos da colônia mãe por mais de 10 gerações tem como consequência a formação de variantes genéticas por deriva genética com formação de sublinhagens (Silver, 1995).

1.4 BIOTERISMO: CONCEITOS E IMPORTÂNCIA.

O bioterismo consiste na conjunção de técnicas de produção de animais adequados para realização de estudos científicos. Busca-se, atualmente, a produção de animais de experimentação padronizados, dentro de normas internacionais (Andrade, 2006).

Em muitos biotérios é comum a divisão das colônias de roedores, na sequência hierárquica decrescente: Colônias de Fundação, Expansão e Produção, Figura 5.

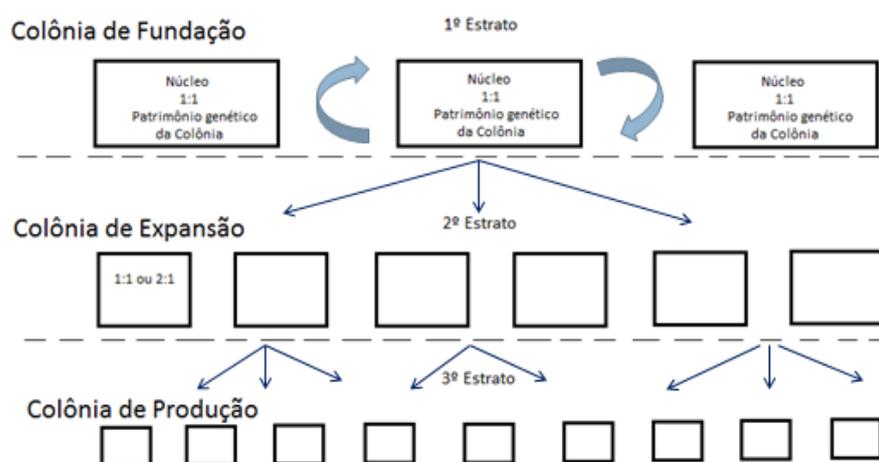


Figura 5. Estratificação de colônias de roedores em um biotério de criação. Mattaraia, 2009.

Entende-se por colônia de Fundação a que deu origem ao plantel e sua principal função é preservar o padrão genético dos primeiros exemplares que a originou. Nesta colônia os acasalamentos são monogâmicos, o que permite controle do patrimônio genético, exatidão dos dados reprodutivos e o cálculo dos índices de produtividade. A colônia de Expansão é aquela estabelecida pelos animais advindos da colônia de Fundação e depende da demanda de animais. A colônia de Produção visa produzir animais suficientes para atender a necessidade dos usuários, de acordo com suas especificações (Mattaraia *et al*, 2009).

1.5 CONTROLE GENÉTICO DAS LINHAGENS DE ANIMAIS MANTIDAS NO BIOTÉRIO.

Ao longo dos últimos 30 anos vários são os relatos de linhagens de camundongos e ratos geneticamente contaminados (ou não autênticos), com o correspondente detrimento dos resultados experimentais obtidos. Isto somente acontece quando não existe o monitoramento ou controle genético dessas linhagens (Wade, 2005).

O genoma das linhagens de camundongos isogênicos mantidos em um biotério pode, ao longo do tempo, sofrer contaminação genética decorrente de erro de manejo ao acasalar inadvertidamente duas linhagens de mesma cor de pelagem ou mesmo por erros de anotações de fichas de identificação, levando também a acasalamentos indevidos (Massironi, 2009). A deriva genética também compromete a isogenicidade das colônias consanguíneas, pois a separação física dos animais gera sub-linhagens que acumulam mutações que se fixam lentamente (Wade, 2005).

A organização da colônia de camundongos cosanguíneos em um biotério é um primeiro passo importante para a monitoração genética, definindo-se colônias de fundação e expansão, evita-se a mistura de animais de mesma cor de pelagem. A colônia de fundação deve ser mantida isolada fisicamente das demais colônias de mesma linhagem em salas separadas, unidades isoladoras ou em racks ventilados. Todas as informações relativas aos dados reprodutivos da colônia de fundação devem ser anotados cuidadosamente para cada casal permitindo a construção de mapas que evidenciem com clareza as relações entre os casais de cada geração. O monitoramento genético deve ser realizado pelo menos uma vez ao ano em todos os casais da colônia de fundação, pois estes dão origem às demais colônias (Jax[®] Notes, 2009; Massironi, 2009).

O controle genético é um conjunto de técnicas que nos permite verificar se os animais que estamos utilizando ainda conservam as características genéticas originais da linhagem a qual pertence, ou que não tenham sofrido nenhuma troca ou contaminação genética de outra linhagem via cruzamentos acidentais. O fundamento do controle da pureza genética consiste em analisar características qualitativas e quantitativas (enzimas, marcadores imunológicos e marcadores de DNA) e compará-los aos valores de referência estabelecidos internacionalmente (Benavides, 1999).

As técnicas mais tradicionais para controle genético de linhagens isogênicas de camundongos consistiam na análise qualitativa da morfologia, comportamento, coloração de pelagem ou isohistogenicidade evidenciada pelo transplante de pele. A análise quantitativa utilizava marcadores bioquímicos, como polimorfismo de proteínas analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida, ou marcadores imunológicos detectados por testes sorológicos. Nenhum dos métodos tradicionais isoladamente era suficiente para o controle genético de uma linhagem. Atualmente, os métodos moleculares substituem os demais métodos, fornecendo, em pouco tempo, grande número de informações genéticas (Massironi, 2009).

Para o controle genético utilizando-se marcadores moleculares selecionam-se marcadores distribuídos por todo o genoma perfazendo de quatro a 10 cromossomos que são examinados rotineiramente a cada geração e monitorados pela sua conformidade com o seu perfil genético (Silver, 1995).

O conceito de um perfil genético é baseado no fato de que cada linhagem de camundongos consanguíneos possui em seus cromossomos um conjunto único de alelos que o distingue de outras linhagens. O desenvolvimento e manutenção subsequente de uma linhagem consanguínea por um sistema rígido de endogamia irá produzir animais que possuam os conjuntos de pares de alelos idênticos ou quase idênticos (Silver, 1995)

Para a construção do perfil genético de uma linhagem isogênica selecionam-se, pelo menos, três marcadores genéticos de cada um dos 19 cromossomos autossômicos, um *locus* próximo de cada extremidade do cromossoma e um ou mais *loci* próximos do centro do cromossomo (Silver, 1995).

Benavides e colaboradores, em 2001, realizaram o monitoramento genético em nove linhagens de camundongos isogênicos SENCAR por análise de polimorfismos de produtos de PCR para marcadores microssatélites. Os produtos de PCR foram visualizados após eletroforese em gel de agarose e comparados com os valores de referência disponíveis no banco de dados online MGI (Benavides, *et al.* 2001)

1.6 MARCADORES GENÉTICOS.

Com a descoberta de que variações na sequência de DNA poderiam ser utilizadas como marcadores genéticos para fazer os traços de herança, os geneticistas de camundongos começaram a buscar formas de identificar tais polimorfismos (Dietrich *et al.*, 1995). Neste sentido, diversos laboratórios ao redor do mundo se empenharam em descobrir novos marcadores genéticos, ou seja, marcadores moleculares que são herdados ao longo das gerações (Petkov, *et al.*, 2004).

Os marcadores genéticos e os mapas de ligação desenvolvidos ao longo dos últimos anos estão hoje disponíveis em bancos de dados *online*. No estudo de camundongos, podemos citar o Mouse Genome Informatics (MGI - <http://www.informatics.jax.org/>) como banco de dados *online* que disponibiliza informações relativas aos milhares de marcadores genéticos já estabelecidos para esta espécie.

Dentre os diversos polimorfismos genéticos que são utilizados como marcadores, podemos citar os polimorfismos de comprimento de fragmento de restrição (RFLPs), os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) e os microssatélites. RFLPs consistem em variações genéticas (em geral, trocas de nucleotídeos, mas também deleções e inserções) que resultam em alteração de sítios de reconhecimento de enzimas de restrição e geram padrões variados de bandas. Desde a sua descoberta, os RFLPs se mostraram abundantes no genoma e aceleraram o mapeamento de vários genes.

Os SNPs como o nome indicam, envolvem a mudança em um único nucleotídeo, geralmente por uma substituição, mas também por deleção ou inserção. Já foram identificados mais de 10 milhões de SNPs distribuídos no genoma murino (MGI, 24/Jun/2012), podendo assim fornecer marcadores extremamente úteis para o mapeamento à alta resolução e também para os estudos de associação à procura de loci que conferem susceptibilidade a doenças comuns.

Os microssatélites são sequências de di, tri ou tetra nucleotídeos repetidas em tandem que apresentam variações de comprimento entre indivíduos e, portanto, são também chamados de polimorfismos de comprimento de sequência simples (SSLPs) ou *short tandem repeats* (STRs). O comprimento da repetição entre indivíduos e entre espécies aparentemente varia devido à derrapagem da DNA polimerase durante a replicação (Dietrich *et al.*, 1995).

A maioria dos microssatélites de camundongos foi desenvolvida com o auxílio do Whitehead Institute/ Massachusetts Institute of Technology (Whitehead/MIT) Center for Genome Research, dentro do Projeto Genoma Humano dos Estados Unidos

(Dietrich *et al.*, 1995). Inicialmente, foram desenvolvidos como marcadores genéticos para humanos por Weber e May, mas começaram a ser utilizados em camundongos por Todd e colaboradores (Dietrich *et al.*, 1995).

Embora não apresentem o interesse de herança dos genes, estes marcadores tornam possível traçar herdabilidade em qualquer cruzamento (Dietrich *et al.*, 1995) e são altamente informativos em estudos de população, análises de pedigree e investigações forenses, pois são muito abundantes (existem mais de 100.000 microssatélites dispersos aleatoriamente ao longo do genoma de mamíferos), facilmente genotipados por PCR, polimórficos, codominantes e multialélicos (O'Brien, 1999).

1.7 A REDE MINEIRA DE BIOTERISMO.

Um levantamento dos principais biotérios de Minas Gerais, entre 1996 e 1998, em um projeto de consultoria especializada, financiado pela FAPEMIG, revelou que nenhum deles possuía todos os requisitos físicos e humanos que garantiriam os padrões de qualidade na produção de animais para experimentação.

Entre outras deficiências, os biotérios analisados apresentavam ausência de barreiras sanitárias rigorosas capazes de impedir a entrada de microrganismos patogênicos nos biotérios, desarticulação e ausência de normas e procedimentos padronizados para produção e manutenção dos animais, inexistência de normas de segurança capazes de fornecerem proteção tanto aos animais quanto aos trabalhadores, ausência de programas de monitorização de qualidade sanitária e genética dos animais produzidos.

Assim, foi criada em 1998, a Rede Mineira de Bioterismo – RMBioterismo – que é uma Cooperação Interinstitucional, visando o desenvolvimento do bioterismo em Minas Gerais e a produção de animais de experimentação biológica que atendam a padrões nacionais e internacionais de qualidade sanitária e genética, além de estabelecer uma relação de intercâmbio entre os biotérios mais expressivos do estado, mas que poderiam aumentar a qualidade da produção.

Oito instituições compõem a rede: o Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG); o Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF); o Biotério Central da Universidade Federal de Lavras (UFLA); o Biotério Central da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP); o Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa (UFV); o Biotério de Pequenos Animais da

Fundação Ezequiel Dias (FUNED), o Biotério do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR) e o Biotério Central da Universidade Federal de São João Del Rei (UFSJ).

Para atender seu objetivo principal, a rede estabeleceu um plano de ações com etapas a serem desenvolvidas em curto, médio e longo prazo visando adequar as instalações e as condições ambientais de criação dos animais; padronizar os equipamentos gerais de biotério; capacitar seus integrantes; introduzir e padronizar as barreiras sanitárias de proteção; padronizar as técnicas de manejo de animais, materiais (gaiolas e bebedouros) e insumos utilizados (ração e maravalha); implantar programas de monitorização da qualidade sanitária e genética dos animais produzidos, bem como o controle da qualidade dos animais produzidos, do meio ambiente e de insumos.

Muitas destas metas, se alcançadas, viabilizariam o intercâmbio de animais saudáveis, genética e microbiologicamente controlados; pesquisas com resultados experimentais confiáveis e reproduzíveis; redução do número de animais utilizados; otimização dos recursos em saúde e segurança do trabalhador; racionalização das criações de modelos animais em Minas Gerais; especialização na produção de determinadas espécies e linhagens genéticas; intercâmbio de experiências e conhecimentos entre os participantes da Rede e desenvolvimento de projetos envolvendo pesquisadores e técnicos das Instituições componentes.

Desde sua criação, os coordenadores dos biotérios participantes da rede, passaram a trabalhar em conjunto, discutindo política de trabalho em Rede, viabilizando cursos de formação de recursos humanos (alguns financiados pela FAPEMIG) e investindo na estrutura física de seus biotérios, por meio de suas instituições e/ou projetos individuais de alguns pesquisadores.

Com o Programa de Apoio às Redes Mineiras da FAPEMIG, iniciado em 2005 e o Programa CT-Infra do Governo, a Rede de Bioterismo vem recebendo suporte financeiro para implementar suas ações.

2. JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento do controle genético para colônias de animais de laboratório tem contribuído para assegurar a autenticidade genética das colônias, protegendo a produção científica dos pesquisadores em todo o mundo. A Rede Mineira de Bioterismo pretende padronizar a criação e manutenção das diferentes linhagens de camundongos nas instituições parceiras. Para conseguir alcançar este objetivo é fundamental conhecer o perfil genético destas linhagens e através deste conhecimento, definir o melhor manejo para sua manutenção.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Determinar o perfil genético das linhagens de camundongos isogênicos criados e mantidos em dois biotérios de produção de instituições parceiras na Rede Mineira de Bioterismo.

3.2 Objetivos específicos

Investigar a identidade de linhagens de camundongos, mantidas nos biotérios pertencentes à Rede Mineira de Bioterismo, através da amplificação de microsátélites polimórficos presentes em moléculas de DNA de alto peso molecular, utilizando a reação de polimerase em cadeia (PCR).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LEVANTAMENTO DE DADOS

Com o intuito de conhecer o quantitativo e a origem de cada linhagem de camundongos mantida em cada uma das instituições pertencentes à Rede Mineira de Bioterismo, fez-se uma entrevista com cada responsável pelos biotérios da rede e construiu-se uma planilha de dados por instituição, incluindo a origem da colônia de fundação, bem como período em que esta colônia é mantida no biotério desde a sua introdução, além do tamanho da colônia.

Este levantamento mostrou-se necessário para podermos buscar amostras de DNA que seriam utilizadas como padrão no estabelecimento do perfil genético das linhagens.

4.2 COLETA DO MATERIAL

Amostras de camundongos isogênicos dos biotérios de produção da UFJF e UFMG, foram coletados cortando-se 1 cm da cauda de cada camundongo pressionando a cauda com uma pinça próximo ao local do corte. Fez-se previamente anestesia da cauda utilizando-se Cloridrato de Lidocaína pomada 50mg EMS® genérico. Utilizou-se para este procedimento contentores além de pinças e tesouras limpas para cada animal.

Coletou-se um total de 120 amostras, sendo 20 casais BALB/c e 20 casais C57BL/6 da colônia de fundação do biotério da UFMG e 10 casais BALB/c e 10 casais C57BL/6 da colônia de fundação do biotério de produção da UFJF.

As amostras extirpadas foram embrulhadas em papel alumínio grosso identificadas e armazenadas em freezer – 80°C até a extração do DNA.

4.3 EXTRAÇÃO DE DNA

Para a extração do DNA dos 120 camundongos utilizados, amostras das caudas foram congeladas em nitrogênio líquido, maceradas em papel manteiga e posteriormente mergulhadas em tampão de lise (Tris HCl 50 mM, pH 8.0; EDTA 10 mM, pH 8.0; 0,5% SDS) e proteinase K, e incubadas em banho Maria à 65°C por 1 hora. Após centrifugação por 20 minutos a 11.000 RPM, o sobrenadante foi recolhido. O DNA precipitado do sobrenadante foi colocado para secar a temperatura ambiente e posteriormente diluído em tampão TE (Tris HCl 10 mM; EDTA 1 mM pH 8.0). Para cada amostra de DNA, a concentração e a pureza foram determinadas pelo nível de absorvância por espectrofotometria sob um comprimento de onda de 260 nm. Cada solução estoque foi diluída em água milliQ para uma concentração final de 25 ng/μL.

4.4 TESTE DE MARCADORES POLIMÓRFICOS ENTRE AS LINHAGENS.

Para a determinação do perfil genético optou-se por utilizar os marcadores microssatélites polimórficos para as duas linhagens em estudo: BALB/c e C57BL/6. A escolha dos microssatélites como marcadores moleculares deve-se ao fato de serem extremamente abundantes no genoma e altamente variáveis, dado que são multialélicos.

Os marcadores microssatélites polimórficos para as duas linhagens (BALB/c e C57BL/6) foram selecionados no banco de dados *online* Mouse Genome Informatics (MGI - <http://www.informatics.jax.org/>), de onde foram retiradas as sequências dos iniciadores (*primers*) a serem utilizados para amplificação por (PCR). Os iniciadores utilizados no mapeamento genético foram sintetizados pela empresa Prodimol.

Utilizaram-se três marcadores por cromossomo, totalizando 60 marcadores para cada animal, figura 6. Os marcadores utilizados encontram-se listados na tabela 3.

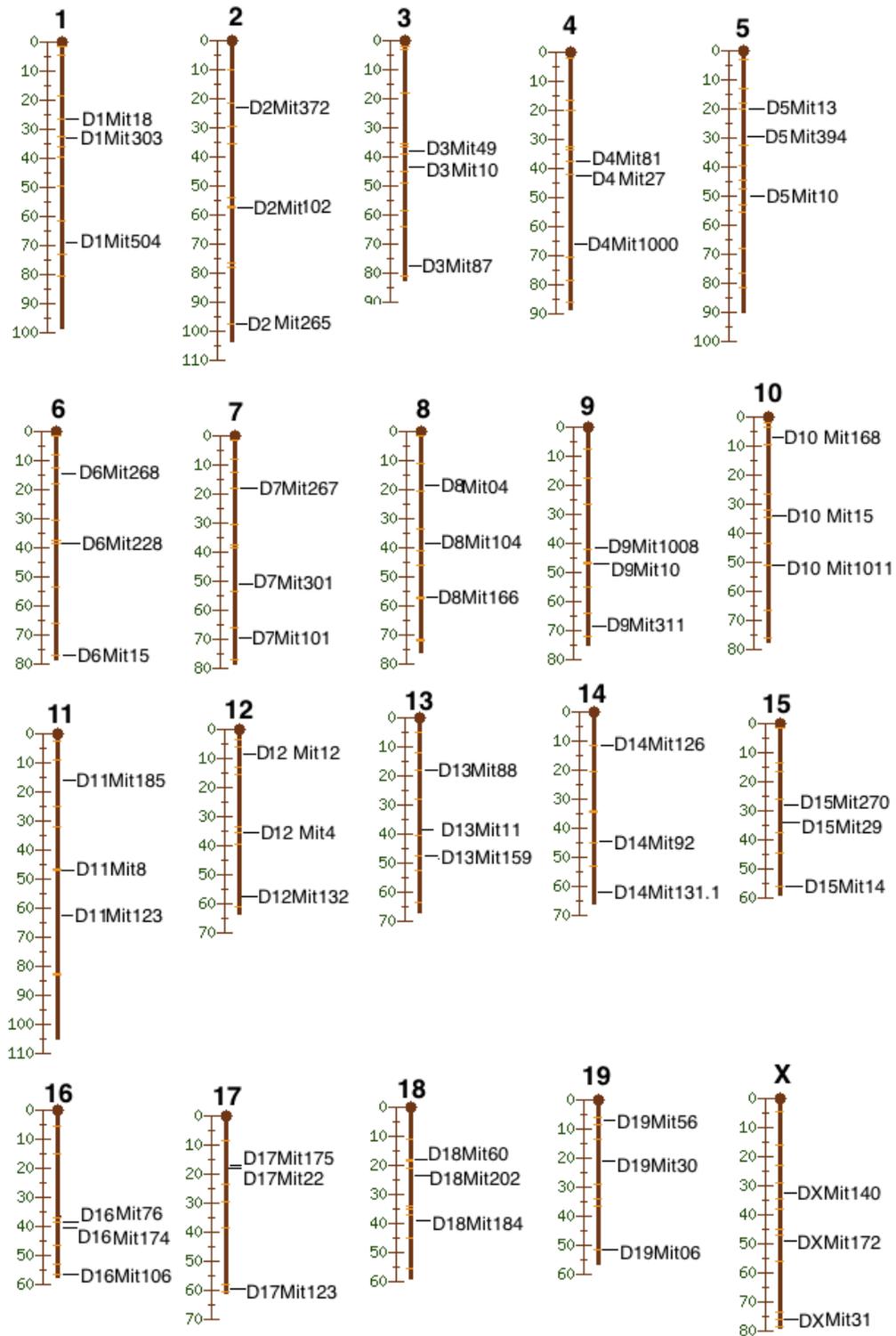


Figura 6. Mapa cromossômico exibindo a posição dos 60 marcadores microsatélites utilizados na genotipagem por PCR.

Tabela 3. Lista dos marcadores microsatélites, (MGI).

Marcador	Localização	Polimorfismo		Marcador	Localização	Polimorfismo	
	cM	BALB/c	C57BL/6		cM	BALB/c	C57BL/6
D1Mit18	26,99	170	160	D11Mit08	47,28	133	155
D1Mit303	34,8	128	118	D11Mit185	16,15	220	186
D1Mit504	69,95	196	148	D11Mit123	63,39	325	310
D2Mit102	57,65	200	162	D12Mit04	35,51	194	202
D2Mit265	97,97	139	103	D12Mit12	8,49	170	146
D2Mit372	24,19	127	123	D12Mit132	57,68	112	131
D3Mit49	39,02	148	128	D13Mit88	18,48	180	170
D3Mit87	77,85	136	132	D13Mit159	47,63	160	142
D3Mit10	430,3	131	142	D13Mit11	39,64	155	145
D4Mit27	42,13	118	150	D14Mit92	45,31	128	90
D4Mit81	37,89	204	160	D14Mit126	11,94	137	141
D4Mit1000	66,22	91	129	D14Mit131.1	63,59	102	108
D5Mit13	20,17	176	194	D15Mit14	56,13	192	188
D5Mit394	29,76	114	154	D15Mit29	34,16	132	152
D5Mit 10	50,64	190	196	D15Mit270	27,16	180	200
D6Mit228	38,94	129	108	D16Mit76	38,95	135	89
D6Mit268	15,12	127	123	D16Mit106	57,68	140	148
D6Mit15	77,7	195	260	D16Mit174	40,84	228	200
D7Mit267	17,09	182	196	D17Mit22	17,98	183	157
D7Mit301	51,2	131	115	D17Mit123	60,67	137	133
D7Mit101	69,01	92	114	D17Mit175	17,25	104	110
D8Mit04	18,89	200	157	D18Mit60	18,04	176	186
D8Mit166	57,82	138	122	D18Mit184	39,7	147	172
D8Mit104	39,16	132	145	D18Mit202	23,29	143	111
D9Mit311	68,74	124	142	D19Mit06	53,12	122	112
D9Mit10	47,35	150	75	D19Mit30	21,34	136	152
D9Mit1008	42,12	155	146	D19Mit56	6,15	130	138
D10Mit15	34,83	171	180	DXMit31	76,03	96	114
D10Mit168	7,94	136	148	DXMit140	33,5	122	108
D10Mit1011	51,2	140	152	DXMit172	49,81	134	148

4.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A amplificação dos 60 marcadores microssatélites selecionados foi realizada pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para todas as amostras coletadas, de acordo com o protocolo descrito na Tabela 4.

Tabela 4 – Protocolo para reação de PCR

Reagentes	Concentração solução estoque	Concentração para 1 reação	Volume da solução estoque para 1 tubo (μL)
H ₂ O	-	-	20,1
Tampão PCR 10X	10X	1X	2,5
dNTP	10 mM	0,2 mM	0,5
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM	0,75
Iniciadores (F+R)	50 mM	0,25 mM	0,25
Taq Polimerase	5U / μL	0,7 U	0,15

DNA : 0,5 μL de solução 100 ng/ μL Volume final da reação = 25 μL

As reações foram efetuadas em termocicladores Peltier Thermal Cycler MJ96+/MJ96G gradiente (Termocicladores Biocycler®). Os programas utilizados obedeceram às seguintes temperaturas: Desnaturação inicial – 94°C durante 1 minuto; Ciclo – 30 ciclos de 94°C durante 30 segundos (Desnaturação), 52°C - 68°C durante 40 segundos (Anelamento), 72°C durante 30 segundos (Extensão); e Fase final – 72°C durante 3 minutos (Extensão final). A temperatura de anelamento ideal para cada par de iniciadores foi padronizada experimentalmente, tomando como base os valores indicados pelo fornecedor dos primers para cada iniciador. As temperaturas de anelamento utilizadas para cada marcador encontram-se descritas na tabela 5.

Tabela 5. Temperatura de anelamento utilizada para cada par de iniciadores.

Marcador	Temperatura °C	Marcador	Temperatura °C	Marcador	Temperatura °C
D1Mit18	56,9	D7Mit101	62,8	D14Mit126	62,9
D1Mit303	55,7	D8Mit04	55,4	D14Mit131.1	64,5
D1Mit 504	55,7	D8Mit166	56,9	D15Mit14	55,5
D2Mit102	55,9	D8Mit104	58,5	D15Mit29	57,2
D2Mit265	52,9	D9Mit311	57,1	D15Mit270	55,6
D2Mit372	56,7	D9Mit10	68,4	D16Mit76	52,5
D3Mit49	53,9	D9Mit1008	62,4	D16Mit106	55,9
D3Mit87	54,3	D10Mit15	56,3	D16Mit174	62,6
D3Mit10	62,3	D10Mit168	56,5	D17Mit22	52,1
D4Mit27	56,8	D10Mit1011	59,2	D17Mit123	57,2
D4Mit81	33,9	D11Mit08	55,3	D17Mit175	59,9
D4Mit1000	64,5	D11Mit185	52,2	D18Mit60	55,6
D5Mit13	54,6	D11Mit123	56,3	D18Mit184	57,8
D5Mit394	36,7	D12Mit04	55,3	D18Mit202	54,6
D5Mit10	60,4	D12Mit12	39,9	D19Mit06	55,9
D6Mit228	54,6	D12Mit132	56,3	D19Mit 30	56,6
D6Mit268	54,8	D13Mit88	56,7	D19Mit 56	54,3
D6 Mit15	57,9	D13Mit159	54,6	DXMit 31	54,2
D7Mit267	55,4	D13Mit11	58,7	DXMit 140	55,3
D7Mit301	54,9	D14Mit 92	52,5	DXMit 172	53,6

4.6 ANÁLISES DE POLIMORFISMOS

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel para a visualização dos fragmentos amplificados. A análise por eletroforese foi realizada em gel de agarose onde marcadores em homozigose, padrão esperado para linhagens isogênicas, apresentariam uma banda única e marcadores em heterozigose, apresentariam duas bandas

Os géis de agarose foram aplicados em cubas horizontais de eletroforese com tampão TBE 1x (Tris 90 mM; Ácido Bórico 90 mM; EDTA 2 mM). O tempo de corrida e a diferença de potencial aplicada foram estabelecidos levando-se em conta a concentração do gel e o polimorfismo do marcador testado. Foi utilizada uma diferença de potencial de 100 V em período de 2 horas. Os géis de agarose foram corados com Brometo de Etídio na concentração de 10 mg/mL, sendo utilizado, aproximadamente,

2,0 μL da solução de brometo para cada 100 mL de gel. A revelação dos géis foi feita por exposição à radiação ultravioleta.

5. RESULTADOS

O levantamento relativo às linhagens e quantidades de camundongos presentes nas colônias de fundação dos principais biotérios da RMBioterismo revelou a prevalência das linhagens isogênicas BALB/c e C57BL/6, como mostrado na tabela 6.

Tabela 6. Informações sobre os biotérios da RMBioterismo**, novembro de 2011.

Instituição	Linhagens de camundongos	Origem das linhagens	Aquisição	Nº de casais fundação	Tipo de acasalamento	Nº médio de prole por casal
Biotério UFMG	C57BL/6	CEMIB - Unicamp	1989	40	<i>Inbred</i>	6
	BALB/c	CEMIB - Unicamp	1989	40	<i>Inbred</i>	6
	Swiss Webster	CEMIB – Unicamp	1989	25	<i>Outbred</i>	9
Biotério UFJF	C57BL/6	CEMIB - Unicamp	2004	107	<i>Inbred</i>	6
	BALB/c	CEMIB – Unicamp	2004	110	<i>Inbred</i>	5
	Swiss Webster	CEMIB – Unicamp	2004	40	<i>Outbred</i>	7
Biotério FUNED	Swiss Webster	Fiocruz-RJ	2002	110	<i>Outbred</i>	10
Biotério UFLA	C57BL/6	UFMG - Cebio	1999	5	<i>Inbred</i>	8
	BALB/c	UFMG - Cebio	1999	5	<i>Inbred</i>	8
Biotério IRR*	C57BL/6	CECAL/FIOCRUZ	1990	64	<i>Inbred</i>	5
	BALB/c	CECAL/FIOCRUZ	1990	64	<i>Inbred</i>	5
	129svev	Instituto Ludwig	2006	8	<i>Inbred</i>	5
	Swiss Webster	CECAL/FIOCRUZ	1990	160	<i>Outbred</i>	10
Biotério UFSJ	C57BL/6	CEBIO –ICB/UFMG	2011	8	<i>Inbred</i>	5
	Swiss Webster	Valle – Uberlândia	2011	10	<i>Outbred</i>	10

(*) O IRR não possui colônia de fundação e sim colônias de expansão que são renovadas semestralmente a partir da Fiocruz/RJ.

(**) (UFMG) Universidade Federal de Minas Gerais, (UFJF) Universidade Federal de Juiz de Fora, (FUNED) Fundação Ezequiel Dias, (UFLA) Universidade Federal de Lavras, (IRR) Instituto René Rachou, (UFSJ) Universidade Federal de São João Del Rei, (CEMIB-Unicamp) CEMIB/UNICAMP – Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na área da ciência de animais de laboratório da Universidade Estadual de Campinas, (CEBIO – ICB/UFMG) Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, (CECAL) Centro de Criação de Animais de laboratório da Fundação Oswaldo Cruz.

Em função da grande quantidade de amostras para genotipagem dos camundongos isogênicos de toda a Rede Mineira de Bioterismo e o curto período de tempo disponível para análise das mesmas, optou-se por estudar as colônias com expressiva produção e que possuíam origens em comum. Assim, os dois biotérios selecionados foram o Biotério de produção da UFMG e o biotério de produção da UFJF,

nos quais os animais adquiridos para a colônia de fundação foram provenientes do CEMIB/ UNICAMP. Desta forma, através desta estratégia de estudos, poderíamos avaliar a evolução de animais de mesma origem e que foram mantidos em instituições diferentes.

O estudo do perfil genético dos camundongos isogênicos dos biotérios de produção da UFMG e UFJF foi realizado através da genotipagem de 120 animais sendo 20 casais BALB/c e 20 casais C57BL/6 da colônia de fundação do biotério da UFMG e 10 casais BALB/c e 10 casais C57BL/6 da colônia de fundação do biotério de produção da UFJF. Foram utilizados 60 marcadores microssatélites, tabela 3, todos polimórficos entre as linhagens BALB/c e C57BL/6.

As amostras de DNA extraídas das linhagens isogênicas de camundongos presentes nestes biotérios foram processadas em reação de PCR conforme indicado no item 4.5. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose na presença de padrão de peso molecular, como mostrado na figura 7, que se refere à genotipagem de uma amostra da linhagem C57BL/6 mantida no biotério da UFMG.

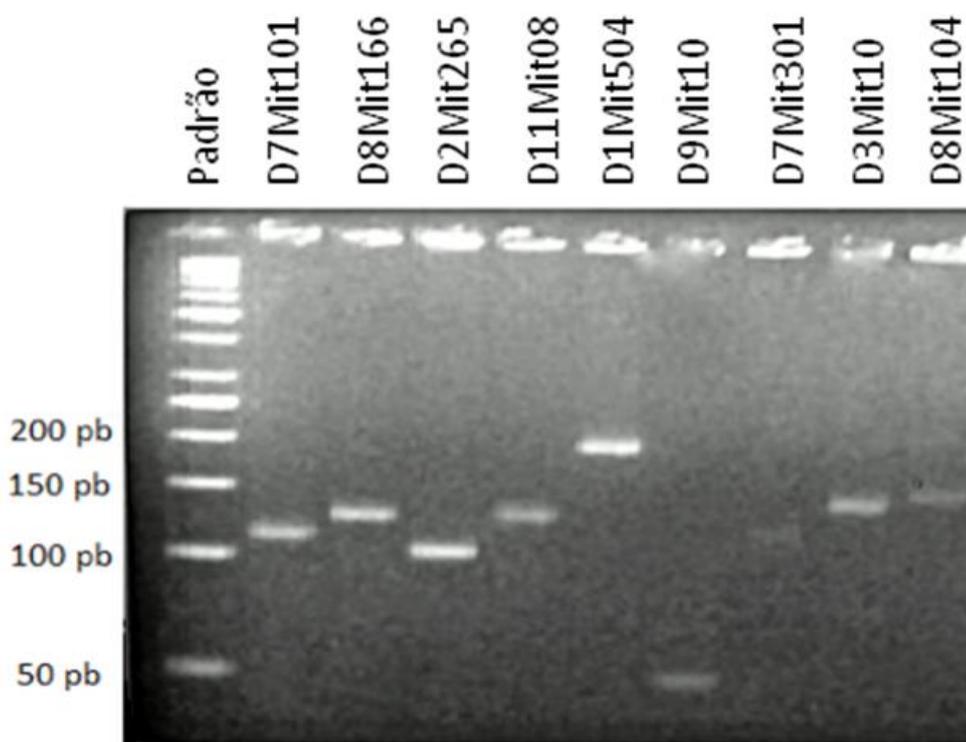


Figura 7. Eletroforese de produtos de PCR para alguns dos marcadores microssatélites utilizados na genotipagem da linhagem C57BL/6 presente no biotério da UFMG.

A análise das bandas permitiu a identificação de quais marcadores se mantinham em homozigose, padrão esperado para linhagens isogênicas, por apresentarem uma banda única e quais se apresentavam em heterozigose, por apresentarem duas bandas.

As linhagens isogênicas apresentam homozigotes para todos os *loci* do genoma (Godard, *et al.*, 1999), porém os resultados da genotipagem no presente estudo revelou heterozigotes para alguns marcadores estudados, tabela 7.

Tabela 7. Marcadores que apresentaram heterozigose na genotipagem dos camundongos do biotério de produção da UFMG.

BALB/c UFMG			C57BL/6 UFMG		
Marcador	Polimorfismos (pb)		Marcador	Polimorfismos (pb)	
D1Mit18	124	100	D7Mit267	196	120
D2Mit265	139	225	D10Mit168	110	70
D8Mit04	200	230			
D11Mit185	220	140			
D19Mit06	180	120			

A linhagem BALB/c, presente no biotério de produção da UFMG, mostrou maior taxa de marcadores em heterozigose, cinco marcadores, o que perfaz cerca de 8% dos marcadores testados. A linhagem C57BL/6, por sua vez teve cerca de 3% das amostras em heterozigose na UFMG, com apenas dois marcadores heterozigotos. Estas mesmas linhagens criadas no biotério da UFJF não revelaram heterozigotes para nenhum dos marcadores testados, figura 8.

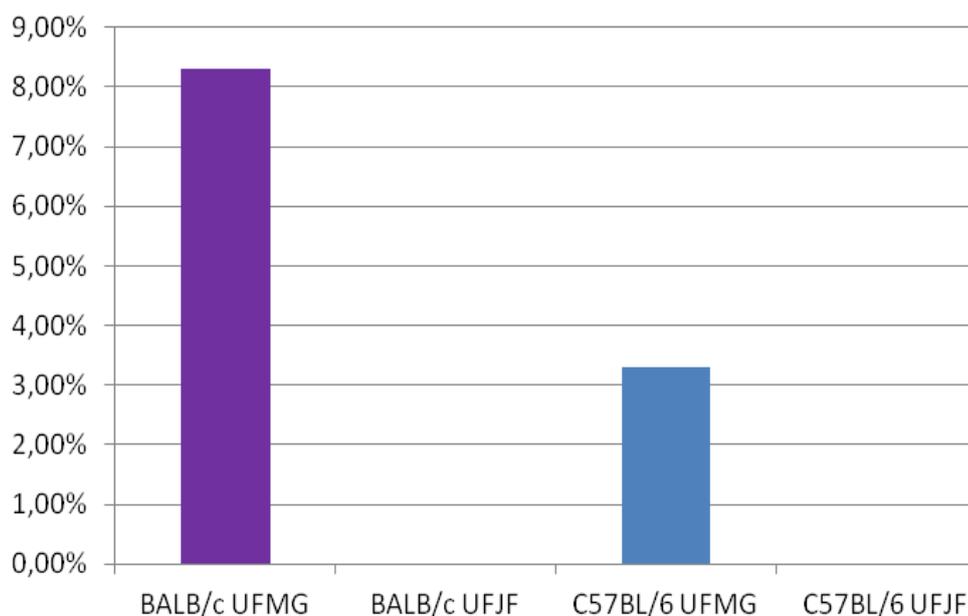


Figura 8. Taxa de marcadores em heterozigose para as linhagens de camundongos BALB/c e C57BL/6 mantidos nos biotérios de produção da UFMG e UFJF.

A tabela 8 apresenta o número de amostras dos camundongos isogênicos BALB/c e C57BL/6 criados no biotério da UFMG que mostraram heterozigose para um mesmo marcador microsatélite pesquisado neste estudo. Os marcadores que revelaram heterozigoses para a linhagem BALB/c mantida no biotério de produção da UFMG possuíam poucos animais heterozigotos por marcador, entre duas e quatro amostras, de um total de 40 amostras.

Os dois marcadores que apresentaram heterozigose para a linhagem C57BL/6 mantida no biotério de criação da UFMG também revelaram duas bandas em poucas das 40 amostras estudadas. O marcador D7Mit267 apresentou duas bandas em quatro amostras, enquanto o marcador D10Mit168 mostrou oito amostras em heterozigose, tabela 8.

Tabela 8. Número de animais em heterozigose por marcador microssatélite testado para as linhagens de camundongos isogênicos BALB/c e C57BL/6 mantidas no biotério de produção da UFMG.

BALB/c UFMG		C57BL/6 UFMG	
(Total de 40 amostras)		(Total de 40 amostras)	
Marcador	Nº de amostras em heterozigose	Marcador	Nº de amostras em heterozigose
D1Mit18	2	D7Mit267	4
D2Mit265	3	D10Mit168	8
D8Mit04	2		
D11Mit185	4		
D19Mit06	4		

A quantidade de amostras que apresentou heterozigose para mais de um marcador é mostrada na tabela 9. As linhagens BALB/c e C57BL/6 mantidas no biotério da UFMG apresentaram cerca de 12% cada, de amostras com mais de um marcador em heterozigose.

Tabela 9. Número de amostras em heterozigose em mais de um marcador microssatélite testado para as linhagens de camundongos isogênicos mantidos nos biotérios de produção da UFMG e UFJF.

	BALB/c UFMG	C57BL/6 UFMG
	(Total de 40 amostras)	(Total de 40 amostras)
Número de amostras em heterozigose para mais de um marcador	5	4

Os marcadores estudados também foram avaliados quanto à divergência em relação aos valores de referência, usados como controle, extraídos do banco de dados *online* Mouse Genome Informatics (MGI - <http://www.informatics.jax.org/>). A tabela 10 apresenta os tamanhos dos produtos de PCR para as linhagens de camundongos BALB/c do biotério de produção da UFMG e a comparação destes com os valores de referência consultados no MGI. Observa-se que três marcadores, destacados em vermelho, apresentam tamanhos de fragmentos diferentes do esperado.

Análise semelhante foi realizada para a linhagem de camundongo BALB/c do biotério de produção da UFJF, bem como para a linhagem C57BL/6 de ambos os biotérios; tabelas 11, 12 e 13, respectivamente. Não houve divergências para os marcadores testados para a linhagem BALB/c do biotério da UFJF em relação aos valores de referência do MGI, ao passo que a linhagem isogênica C57BL/6 deste mesmo biotério apresentou apenas uma divergência, constatada no marcador D19Mit56 com produto de 180 pb e que possui como referência no MGI 123 pb.

Nos *loci* microssatélites D1Mit504; D6Mit268; D8Mit04; D11Mit08; D15Mit270 e D19Mit06 monitorados, houve divergência em relação ao tamanho de cada marcador para as linhagens de camundongos isogênicos C57Bl/6 mantidos no biotério de produção da UFMG, quando comparados com os valores de referência do MGI, tabela 12.

Tabela 10. Comparação do tamanho dos produtos amplificados (pb) para os marcadores microssatélites com as informações contidas no banco de dados MGI para as linhagens isogênicas de camundongo BALB/c mantida no biotério de produção da UFMG.

Marcador	Referência MGI BALB/c (pb)	Resultado BABL/c UFMG (pb)	Marcador	Referência MGI BALB/c (pb)	Resultado BABL/c UFMG (pb)
D1Mit303	128	128	D12Mit132	112	112
D3Mit87	136	136	D13Mit159	160	160
D3Mit10	131	131	D13Mit11	155	155
D4Mit27	118	118	D14Mit92	128	128
D4Mit1000	91	91	D14Mit126	137	137
D5Mit13	176	176	D14Mit131.1	102	102
D5Mit10	190	190	D15Mit29	132	170
D6Mit15	195	195	D15Mit270	180	180
D7Mit101	92	92	D16Mit76	135	110
D8Mit166	138	138	D16Mit106	140	140
D8Mit104	132	132	D16Mit174	228	228
D9Mit311	124	150	D17Mit22	183	183
D9Mit10	150	150	D17Mit123	137	137
D9Mit1008	155	155	D17Mit175	104	104
D10Mit15	171	171	D18Mit60	176	176
D10Mit168	136	136	D19Mit30	136	136
D10Mit1011	140	140	D19Mit56	130	130
D11Mit08	133	133	DXMit31	96	96
D11Mit123	325	325	DXMit140	122	122
D12Mit04	194	194	DXMit172	134	134

(*) Em vermelho os marcadores que apresentaram divergência em relação à referência e em verde os que coincidiram com a referência.

Tabela 11. Comparação do tamanho dos produtos amplificados (pb) para os marcadores microssatélites com as informações contidas no banco de dados MGI para as linhagens isogênicas de camundongo BALB/c mantida no biotério de produção da UFJF.

Marcador	Referência MGI BALB/c (pb)	Resultado BABL/c UFJF (pb)	Marcador	Referência MGI BALB/c (pb)	Resultado BABL/c UFJF (pb)
D1Mit18	170	170	D11Mit185	220	220
D1Mit303	128	128	D11Mit123	325	325
D2Mit102	200	200	D12Mit04	194	194
D2Mit265	139	139	D12Mit12	170	170
D3Mit87	136	136	D12Mit132	112	112
D3Mit10	131	131	D13Mit159	160	160
D4Mit27	118	118	D13Mit11	155	155
D4Mit81	204	204	D14Mit92	128	128
D4Mit1000	91	91	D14Mit126	137	137
D5Mit13	176	176	D14Mit131.1	102	102
D5Mit394	114	114	D15Mit14	192	192
D5Mit10	190	190	D15Mit29	132	132
D6Mit228	129	129	D15Mit270	180	180
D6Mit268	127	127	D16Mit76	135	135
D6Mit15	195	195	D16Mit106	140	140
D7Mit267	182	182	D16Mit174	228	228
D7Mit301	131	131	D17Mit22	183	183
D7Mit101	92	92	D17Mit123	137	137
D8Mit04	200	200	D17Mit175	104	104
D8Mit166	138	138	D18Mit60	176	176
D8Mit104	132	132	D18Mit184	147	147
D9Mit311	124	124	D18Mit202	143	143
D9Mit10	150	150	D19Mit06	122	122
D9Mit1008	155	155	D19Mit30	136	136
D10Mit15	171	171	D19Mit56	130	130
D10Mit168	136	136	DXMit31	96	96
D10Mit1011	140	140	DXMit140	122	122
D11Mit08	133	133	DXMit172	134	134

Tabela 12. Comparação do tamanho dos produtos amplificados (pb) para os marcadores microssatélites com as informações contidas no banco de dados MGI para as linhagens isogênicas de camundongo C57BL/6 mantida no biotério de produção da UFMG.

Marcador	Referência MGI C57BL/6 (pb)	Resultado C57BL/6 UFMG (pb)	Marcador	Referência MGI C57BL/6 (pb)	Resultado C57BL/6 UFMG (pb)
D1Mit18	160	160	D11Mit185	186	186
D1Mit303	118	118	D11Mit123	310	310
D1Mit504	148	196	D12Mit04	202	202
D2Mit102	162	162	D12Mit12	146	146
D2Mit265	103	103	D13Mit159	142	142
D3Mit87	132	132	D13Mit11	145	145
D3Mit10	142	142	D14Mit92	90	90
D4Mit27	150	150	D14Mit126	141	141
D4Mit81	160	160	D14Mit131.1	108	108
D4Mit1000	129	129	D15Mit14	188	188
D5Mit13	194	194	D15Mit29	152	152
D5Mit394	154	154	D15Mit270	200	102
D5Mit10	196	196	D16Mit76	89	89
D6Mit268	123	150	D16Mit106	148	148
D6Mit15	260	260	D16Mit174	200	200
D7Mit301	115	115	D17Mit22	157	157
D7Mit101	114	114	D17Mit123	133	133
D8Mit04	157	149	D17Mit175	110	110
D8Mit166	122	122	D18Mit184	172	172
D8Mit104	145	145	D18Mit202	111	111
D9Mit311	142	142	D19Mit06	112	145
D9Mit10	50	50	D19Mit30	152	152
D9Mit1008	146	146	D19Mit56	138	138
D10Mit15	180	180	DXMit31	114	114
D10Mit1011	152	152	DXMit140	108	108
D11Mit08	155	125	DXMit172	148	148

(*) Em vermelho os marcadores que apresentaram divergência em relação à referência e em verde os que coincidiram com a referência.

Tabela 13. Comparação do tamanho dos produtos amplificados (pb) para os marcadores microssatélites com as informações contidas no banco de dados MGI para as linhagens isogênicas de camundongo C57BL/6 mantida no biotério de produção da UFJF.

Marcador	Referência MGI C57BL/6 (pb)	Resultado C57BL/6 UFJF (pb)	Marcador	Referência MGI C57BL/6 (pb)	Resultado C57BL/6 UFJF (pb)
D1Mit18	160	160	D11Mit123	310	310
D1Mit303	118	118	D12Mit04	202	202
D1Mit504	148	148	D12Mit12	146	146
D2Mit102	162	162	D12Mit132	131	131
D2Mit265	103	103	D13Mit88	170	170
D3Mit87	132	132	D13Mit159	142	142
D3Mit10	142	142	D13Mit11	145	145
D4Mit27	150	150	D14Mit92	90	90
D4Mit81	160	160	D14Mit126	141	141
D4Mit1000	129	129	D14Mit131.1	108	108
D5Mit13	194	194	D15Mit14	188	188
D5Mit394	154	154	D15Mit29	152	152
D5Mit10	196	196	D15Mit270	200	200
D6Mit228	108	108	D16Mit76	89	89
D6Mit268	123	123	D16Mit106	148	148
D6Mit15	260	260	D16Mit174	200	200
D7Mit267	196	196	D17Mit22	157	157
D7Mit301	115	115	D17Mit123	133	133
D7Mit101	114	114	D17Mit175	110	110
D8Mit04	157	157	D18Mit60	186	186
D8Mit166	122	122	D18Mit184	172	172
D8Mit104	145	145	D18Mit202	111	111
D9Mit311	142	142	D19Mit06	112	112
D9Mit10	75	75	D19Mit30	152	152
D9Mit1008	146	146	D19Mit56	138	180
D10Mit168	148	148	DXMit31	114	114
D10Mit1011	152	152	DXMit140	108	108
D11Mit08	155	155	DXMit172	148	148
D11Mit185	186	186			

(*) Em vermelho o marcador que apresentou divergência em relação à referência e em verde os que coincidiram com a referência.

6. DISCUSSÃO

Em função do grande número de amostras para monitoramento genético em todos os biotérios da rede e o curto período de tempo disponível para estudo das mesmas, optou-se pela estratégia de investigar as duas principais linhagens de camundongos isogênicos (BALB/c e C57BL/6) em dois dos biotérios com expressiva produção destas linhagens, as quais possuem origem em comum. Trata-se dos biotérios de produção da UFMG e da UFJF. As linhagens de BALB/c e C57BL/6 presentes hoje nos biotérios supracitados são provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na área da Ciência de Animais de Laboratório (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Para comparação do *background* genético dos animais mantidos nos dois biotérios de Minas Gerais com sua fonte, presente em São Paulo seria conveniente termos o perfil genético dos animais do CEMIB para utilização como controle. No entanto, utilizamos como referência, os tamanhos dos microssatélites estudados a partir do banco de dados MGI, organizado pelo The Jackson Laboratory, instituto norte americano de pesquisa biomédica, de onde foram adquiridas as linhagens presentes no CEMIB.

As linhagens de camundongos isogênicos são amplamente utilizadas na pesquisa científica, assim, a Rede Mineira de Bioterismo (RMBioterismo) tem atualmente, concentrado esforços na produção de linhagens de camundongos isogênicos, com destaque para as linhagens BALB/c e C57BL/6.

Levando-se em conta a relevância do uso de camundongos geneticamente definidos na pesquisa biomédica, sua constituição genética deve ser definida e monitorada para obtenção de resultados reprodutíveis.

Nitzki e colaboradores, em 2007, realizaram um estudo de detecção de contaminação genética utilizando marcadores microssatélites em linhagens de camundongos C57BL/6. O estudo demonstrou contaminação com outra linhagem também criada no mesmo biotério.

O genoma das linhagens de camundongos consanguíneos está sujeito à contaminação genética e também à deriva genética. Uma das principais causas de contaminação genética se dá por erro no manejo, ao cruzar duas linhagens distintas, mas com fenótipo semelhante para pigmentação dos pelos ou ainda por cometer equívocos no preenchimento de fichas e anotações erradas. Assim, na estruturação de um biotério

deve-se manter fisicamente separadas as colônias de fundação das demais colônias reduzindo-se algumas fontes de contaminação genética. Todos os dados reprodutivos da colônia de fundação devem ser cuidadosamente registrados, criando-se mapas genéticos que deixem claras as relações entre os casais de cada geração, figura 9.

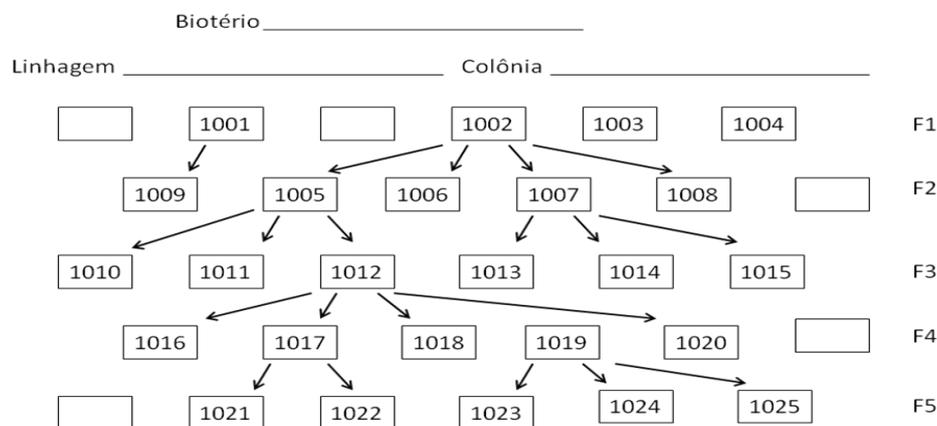


Figura 9. Exemplo de um mapa genético de camundongos isogênicos. Cada número representa um casal, em cada linha são registrados casais de uma geração. As flechas indicam a descendência. No exemplo, seleciona-se um ou dois casais de cada geração para dar origem à geração seguinte (Massironi, 2006).

Do ponto de vista genético, espera-se que uma linhagem isogênica apresente homozigose para todos os alelos de seu genoma, uma vez que o acasalamento consanguíneo diminui a frequência de genótipos heterozigotos, gerando um estado homoalélico, ou seja, onde há uma só variante alélica presente que leva à fixação dos alelos desse grupo. Cerca de 8% dos marcadores microssatélites utilizados no presente estudo estão em heterozigose para a colônia de camundongos isogênicos BALB/c criada no biotério de produção da UFMG, tabela 7. Esta taxa de heterozigose pode ser explicada por deriva genética, uma vez que não houve renovação da colônia de fundação neste biotério há mais de 20 anos. Esta hipótese é fortalecida quando se compara à ausência de heterozigose para a mesma linhagem BALB/c, mantida no biotério da UFJF por menos de uma década e cuja origem é a mesma da colônia de fundação presente na UFMG.

O isolamento reprodutivo de linhagens de camundongos isogênicos por um longo período de tempo pode também levar a mudanças no *background* genético de uma linhagem em relação ao seu genoma de origem (Wade, *et al* 2005). Este fato se deve à deriva genética que atua como mecanismo microevolutivo que modifica aleatoriamente as frequências alélicas ao longo do tempo. Podem assim, ser geradas

sub-linhagens que acumulam mutações que se fixam lentamente, sendo detectadas com maior dificuldade.

Outra explicação para os resultados encontrados consiste no erro de manejo, porém há fortes indícios de deriva genética, pois observa-se para ambas as linhagens isogênicas estudadas no biotério da UFMG poucos animais em heterozigose para um mesmo marcador, tabela 8.

Foi constatada divergência do *background* genético para ambas as linhagens isogênicas da UFMG, demonstrada pela diferença no produto de amplificação (pb) entre as linhagens testadas e os valores de referência do MGI. Esta divergência pode ser explicada pelo longo período de tempo que estas linhagens são criadas sem renovação, ou seja, há 24 anos, tabela 6. A linhagem BALB/c mantida no biotério de produção da UFMG revelou três marcadores em divergência em relação à referência, tabela 10; enquanto a linhagem C57BL/6 do mesmo biotério apresentou divergência ainda maior, contabilizando seis marcadores diferentes da referência, tabela 12.

Para a linhagem de camundongos isogênicos BALB/c, presente no biotério de produção da UFJF desde 2004, não foi constatada divergência de *background* genético para nenhum dos marcadores em homozigose, tabela 11, enquanto apenas um marcador em homozigose apresentou divergência para a linhagem de C57BL/6, tabela 13. Estes resultados reforçam a hipótese de que quanto maior o tempo de isolamento reprodutivo das linhagens de sua fonte de origem, maior a probabilidade de deriva genética e, portanto, divergência de *background* genético que se fixam nas linhagens, haja vista que a colônia de animais presentes no biotério da UFJF foi fundada a oito anos e no biotério da UFMG a 24 anos, sem renovação. Diante dos resultados e de acordo com Wotjak, 2003 e Silver, 1995, podemos concluir que a separação das colônias de camundongos isogênicos da colônia mãe por vários anos teve como consequência a formação de variantes genéticas por deriva genética com formação de sublinhagens de BALB/c e C57BL/6 no biotério da UFMG.

7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

O estudo do perfil genético das linhagens de camundongos isogênicos BALB/c e C57BL/6 presentes em dois biotérios da Rede Mineira de Bioterismo revelou heterozigoses para as duas linhagens mantidas no biotério de produção da UFMG e apenas homozigoses nos animais criados no biotério da UFJF. A taxa de marcadores em heterozigose foi significativa no biotério da UFMG, perfazendo taxas de 8% de heterozigoses em BALB/c e 3% na linhagem C57BL/6.

Estas linhagens são provenientes do CEMIB/UNICAMP, biotério de produção da Universidade Estadual de Campinas. Contudo, a colônia de fundação para ambas as linhagens presentes na UFMG datam de mais de vinte anos, enquanto que na UFJF as mesmas estão presentes por menos de uma década. Este longo período de criação de animais sem renovação de colônias de fundação, principalmente no biotério de produção da UFMG, foi decisivo para a ocorrência de deriva genética gerando flutuações aleatórias nas frequências dos alelos estudados e, eventualmente, à fixação ou à perda de alelos.

As linhagens de BALB/c e C57BL/6 presentes no biotério de produção da UFMG mostraram, respectivamente, três e seis marcadores divergentes quando contrastados com os valores de referência utilizados como controle que se encontram no banco de dados do MGI. Não houve divergência para a linhagem BALB/c mantida no biotério da UFJF e apenas uma divergência para a linhagem C57BL/6 deste último biotério.

Tanto as heterozigoses encontradas como as divergências dos marcadores em relação aos valores de referências do MGI são indicativos de formação de sub-linhagens de BALB/c e C57BL/6 em relação aos animais que foram introduzidos no biotério de criação da UFMG.

A perspectiva é que, a partir deste ano de 2013, com o início das atividades do Biotério Central da UFMG, as colônias de fundação das linhagens de camundongos isogênicos BALB/c e C57BL/6, que chegarão certificadas geneticamente, a partir do CEMIB/UNICAMP possam ser monitoradas a partir de mapas e monitoramento

genéticos, tornando sempre conhecido o *background* genético das mesmas. O presente trabalho servirá como ferramenta para este controle não só na UFMG, mas permitirá intercâmbio de informações em toda a Rede Mineira de Bioterismo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGCA, Y. Genome resource banking of biomedically important laboratory animals. *Theriogenology* 78. 1653-1665, 2012.

ANDRADE, A. Bioterismo: evolução e importância. In: ANDRADE, A; PINTO, S.C; OLIVEIRA, R. S. *Animais de laboratório*; criação e experimentação. Rio de Janeiro: Fiocruz, p.19, 2006.

Animais reproduzidos. *Mus musculus*. 2006. Disponível em URL: <HTTP://WWW.reitoria.ufsc.br/prpg/biotério>.

BECK, J. A., LLOYD S., HAFEZPARAST, M., LEONNON-Pierce M., EPPIG J. T., FESTING, M. F. W., FICHER, E. M. C. Genealogies of mouse inbred strains. *Nature genetics* 24: 23-25, 2000.

BENAVIDES, F. Genetic Contamination of SJL/J mouse colony: Rapid Detection by PCR-based microsatellite analysis. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science* 38, 54-55. 1999.

BENAVIDES, F.; GLASSCOCK, E.; COGHLAN, L. G.; STERN, M. C.; WEISS, D. A.; CONTI, C. J. PCR-based microsatellite analysis for differentiation and genetic monitoring of nine inbred SENCAR mouse strains. *Laboratory Animals* 35, 157-162, 2001.

BRAGA, L. M. G. M. O animal como um modelo experimental. In: FEIJÓ, A. G. S, BRAGA, L. M. G. M, PITREZ, P. M. C. *Animais na pesquisa e no ensino: aspectos éticos e técnicos*. edPUCRS, p. 173, 2010.

CARVALHO NETO, C. *Manual prático de Biologia e controle de roedores*. São Paulo: Ciba-Geigy, 1987.

CASELLAS J. Inbred mouse strains and genetic stability: a review. *Animal*. 5:1.p1-7, 2010.

CEC. Commission of the European Communities. Report from the Commission to the Council and the European Parliament on the development, validation and legal

acceptance of the alternative methods to animal tests in the field of cosmetic. Brussels, p. 11, 2005.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R. N., Animais de laboratório : o camundongo, *Revista Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, vol. 28, n.1, p. 11-23, 2007.

DIETRICH, W. F.; COPELAND, N. G.; GILBERT, D. J.; MILLER, J.C.; JENKINS, N. A.; LANDER, E. S. Mapping the mouse genome: current status and future prospects. *Proc Natl Acad Sci.*, 21; 92(24): 10849–10853, 1995.

EBISIU, L; FONTES, R. S; LAPCHIK, V. B. V. Rato. In: LAPCHIK, V. B. V; MATTARAIA, V. G. M; KO, G. M. Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório. Atheneu. p. 257 – 398, 2009.

GODARD, A. L. B; GUÉNET, J. L. Genética de camundongos: Modelos animais de doenças humanas. *Biotecnologia – Ciência e Desenvolvimento*. p. 96, 1999.

GODARD, A. L. B. A Clonagem Posicional – uma abordagem para o estudo do genoma funcional, *Monografias SBG*, Ribeirão Preto: SBG, 151 p., 2008.

GUÉNET, J.L; BONHOMME, F. Wild mice: An ever-increasing contribution to a popular mammalian model. *Trends Genet.* **19**: 24-31, 2003

GUÉNET, J. L. The mouse genome, *Genome Research*, vol. 15, p. 1729-1740, 2005.

GUÉNET, J. L. Animal models of human genetic diseases: do they need to be faithful to be useful? *Mol. Genet. Genomics*. 286:1-20, 2011.

HARTL, D. L., CLARK, A. G. Principles of Population Genetics, 3 d ed. Sunderland, MA: Sinaure, 1997.

HEDRICK, P. W. Genetics of Populations. Science Books International, Boston. 629 p, 1983.

JAX[®] NOTES. Genetic Background: Understanding its importance in mouse-based biomedical research. JAX[®] NOTES 513:5-6.

KO, G. M; DE LUCA, R.R. Camundongo. In: LAPCHIK, V. B. V; MATTARAIA, V. G. M; KO, G. M. Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório. Atheneu. p. 137 – 165, 2009.

MACINTYRE, R. J. Molecular Evolutionary Genetics. New York: Plenum, 1985.

MASSIRONI, S. M. G. Padrão genético. In: LAPCHIK, V. B. V; MATTARAIA, V. G. M; KO, G. M. Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório. Atheneu. p. 385 – 398, 2009.

MASSIRONI, Silvia Maria Gomes; REIS, Bruno Luiz Fonseca Schamber; CARNEIRO, Juliana Garcia ; BARBOSA, Lucas Boaventura da Silva; ARIZA, C B; SANTOS, Gustavo Costa; GUÉNET, Jean-louis; GODARD, A. L. B. Inducing mutations in the mouse genome with the chemical mutagen ethylnitrosourea. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 39, p. 1217-1226, 2006.

MATTARAIA, V. G. M., LAPCHIC, V. B. V., KO, G. M. Rotina de Manejo das Espécies. In: Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório. p.254, 2009.

MCDONALD, D. The encyclopedia of Mammals. Andromeda Oxford limited. 1ª Edition – 21 – 86, 1999.

MENENDEZ, R. C. Animales de laboratorio em las investigaciones biomédicas, Cuba, La Habana Editorial. Ciencias medicas. p203, 1985.

MGI – Mouse Genome Informatics (www.informatics.jax.org).

O'BRIEN, S.J.; MENOTTI-RAYMOND, M.; MURPHY, W.J.; NASH, W.G.; WIENBERG, J.; STANYON, R.; COPELAND, N.G.; JENKINS, N.A.; WOMACK, J.E.; GRAVES, J.A.M. The Promise of Comparative Genomics in Mammals, *Science*, vol. 286, p. 458-62 479-81, 1999.

OLIVEIRA, J. R; PITREZ, P. M. A importância do uso de animais para o avanço da ciência. In: FEIJÓ, A. G. S; BRAGA, L. M. G. M; PITREZ, P. M. Animais na pesquisa e no ensino: aspectos éticos e técnicos. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2010. p. 67.

PETKOV, P. M.; CASSELL, M. A.; SARGENT, E.; DONNELLY, C.; ROBINSON, P.; CREW, V.; ASQUITH, S.; HAAR, R.; WILES, M. Development of SNP genotyping panel for genetic monitoring of the laboratory mouse. *Genomics* 83, 902-911, 2004.

RIVERA, E. A. B. Ética na Experimentação Animal. In: ANDRADE, A; PINTO, S.C; OLIVEIRA, R. S. *Animais de laboratório*; criação e experimentação. Rio de Janeiro: Fiocruz. p.25, 2006.

SANTOS, B. F. Criação e Manejo de Camundongos. In: ANDRADE, A; PINTO, S.C; OLIVEIRA, R. S. *Animais de laboratório*; criação e experimentação. Rio de Janeiro: Fiocruz. P.115, 2006.

SILVER, L. M. *Mouse Genetics – Concepts and Applications*. Oxford University Press, New York, 1995.

SIMMONS, J.G. *Médicos e descobridores – vidas que criaram a Medicina de hoje*. São Paulo: Record, 2004.

TAFT, R. A; Davisson, M; Wiles, M. V. Know Thy Mouse. *Opinion. Trends in Genetics*. Vol. 22. nº12, 2006.

WADE C. M., DALY. J. Genetic variation in laboratory mice. *Nature Genetics*. 37:1175-1179, 2005.

WOTJAK, C. T. C57Black/BOX? The importance of exact mouse strain nomenclature. *Trends Genet* 12:975-84, 2003.