INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA EVOLUTIVA

INVESTIGAÇÃO DA ISOGENIA DE LINHAGENS DE CAMUNDONGOS *Mus musculus* ALOJADOS EM DOIS BIOTÉRIOS DA CIDADE DE MANAUS, AMAZONAS

LAIS ALMEIDA GOMES

Manaus, Amazonas

Março, 2014

LAIS ALMEIDA GOMES

INVESTIGAÇÃO DA ISOGENIA DE LINHAGENS DE CAMUNDONGOS *Mus musculus* ALOJADOS EM DOIS BIOTÉRIOS DA CIDADE DE MANAUS, AMAZONAS

Orientadora: Dra. Gislene Almeida Carvalho-Zilse
Co-Orientador: Dr. Fábio Tonissi Moroni

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

Manaus, Amazonas

Março, 2014

G633 Gomes, Lais Almeida
Investigação da isogenia de linhagens de camundongos *Mus musculus* alojados em dois biotérios da cidade de Manaus, Amazonas / Lais Almeida Gomes. --- Manaus: [s.n], 2014.
xiii, 53 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) --- INPA, Manaus, 2014.
Orientador : Gislene Almeida Carvalho-Zilse.
Coorientador : Fábio Tonissi Moroni.
Área de concentração : Genética, Conservação e Biologia Evolutiva

1. Monitoramento Genético. 2. Linhagens Isogênicas. 3. Mutações. I. Título.

CDD 575.292

Sinopse:

Investigou-se a isogenia de linhagens de camundongos *Mus musculus* em dois biotérios de Manaus, Amazonas, por meio de marcadores microssatélites. Aspectos relacionados a causa e fontes de contaminação genética em animais de laboratório foram discutidos.

Palavras-chave: monitoramento genético, microssatélites, linhagens isogênicas, mutações.

DEDICATÓRIA

Aos roedores que foram sacrificados para a realização desse projeto.

A cada um deles, o meu mais profundo respeito.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Dra. Gislene Almeida Carvalho-Zilse que aceitou me orientar e apoiar em uma área diferente de sua linha de pesquisa, e mesmo assim não me deixou faltar nada em relação a orientações científicas e experimentais. É a pesquisadora mais generosa e completa que já conheci.

Ao meu co-orientador, Dr. Fábio Tonissi Moroni, que despertou em mim a vontade de fazer ciência na área de animais de laboratório, desde a metade da minha graduação, gerando todo o estímulo necessário e que foi suficiente para que eu conseguisse começar e terminar esse trabalho.

Agradeço à FAPEAM pelo apoio financeiro. Ao INPA, o qual ofereceu a estrutura necessária para que o trabalho fosse realizado, e também ao Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM) na UFAM, que sempre me recebeu e abriu as portas dos seus laboratórios de forma irrestrita para quaisquer necessidades.

Aos Biotérios Centrais, que concederam os animais para que a pesquisa fosse realizada, e deram apoio aos procedimentos necessários.

Agradeço aos técnicos dos Biotérios, principalmente ao Frank, Leonardo e Andressa Karina, que me ajudaram na coleta dos animais, e realização dos testes de acasalamento, e sempre foram muito atenciosos com o meu projeto.

Ao Grupo de Pesquisas em Abelhas (GPA), sobretudo à Diana, que começou e terminou esse projeto junto comigo. Apesar de não trabalhar com roedores nunca deixou eu me sentir sozinha nesse mestrado, sempre ouviu meus planos, meus desabafos, minhas animações, minhas tristezas, e sempre se preocupava com minhas dificuldades e me ajudou a superá-las, e que fez toda a diferença nesses dois anos. Sem sua amizade, certamente, as coisas teriam sido mais difíceis.

A ajuda dos professores e integrantes do Laboratório de Tecnologia do DNA (UFAM), Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho, Prof. Dr. Edmar Vaz de Andrade, Prof. Dr. Adolfo Mota, entre outros, que me ajudaram desde a discussão da melhor maneira de realização de alguns procedimentos experimentais e às vezes me ajudavam na análise dos resultados,

especialmente à Msc. Dina Nogueira, que esteve boa parte do tempo dando boas ideias, pensando e analisando junto comigo.

Aos profissionais que já possuem longa carreira na área de Ciência de Animais de Laboratório, como Dr. Fernando Benavides, Dra. Ana Lúcia Godard, Dr. Luiz Augusto Passos, Dr. Marcel Frajblat, que me ajudaram fornecendo direcionamentos, informações, sugestões, protocolos, e alguns deles me empolgavam para realizar o trabalho em momentos que o desânimo tomava conta, ou quando ouvia críticas destrutivas de profissionais alheios à área.

Agradeço aos amigos que fiz da turma de mestrado, pela amizade e compartilhamento de experiências em comuns, principalmente ao Rômulo, que sempre soube dizer as palavras certas para que eu não enlouquecesse.

Aos meus pais, que sempre acreditaram em mim, e me dão todo o apoio e base necessária. Às minhas tias, que sempre formaram as minhas primeiras bancas de prévias de qualificações e apresentações, sempre ouviam minhas explicações com atenção e sempre estiveram por dentro do meu projeto. Ao Thálison, que chegou a ir muitas vezes ao laboratório comigo, e me fazia companhia quando eu tinha que ficar sábados, domingos, ou até mais tarde fazendo experimentos.

A todos que colaboraram, direta ou indiretamente, para a produção deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

A proposta do presente estudo foi investigar o perfil genético de três linhagens isogênicas de camundongos *Mus musculus* (BALB/c, DBA/2 e C57BL/6) criados e mantidos em dois biotérios (A e B) da cidade de Manaus, utilizando marcadores microssatélites disponíveis em bancos de dados, para as linhagens em questão. De 23 locos testados, 10 foram utilizados: D1Mit17, D3Mit49, D3Mit86, D5Mit79, D6Mit201, D8Mit4, D9Mit26, D10Mit233, D11Mit41 e DXMit95. Observaram-se indivíduos heterozigotos para cinco locos (D1Mit17, D5Mit79, D8Mit4, D11Mit41, DXMit95), e em dois locos detectou-se alelos de tamanhos não correspondentes ao esperado (D3Mit49 e D3Mit86), em pelo menos uma das linhagens avaliadas. Apesar de não se esperar polimorfismo para as linhagens analisadas, os valores de heterozigosidade média variaram de 0,05 (linhagem BALB/c da Instituição B) a 0,166 (linhagem BALB/c da Instituição A). Portanto, a presença de heterozigotos e novos alelos em todas as linhagens estudadas demonstram que há variabilidade genética nestas linhagens. Tais polimorfismos podem ter se originado pela ocorrência de cruzamentos acidentais, mutações, heterozigosidade residual ou recombinações meióticas, resultando em diversidade genética nas linhagens. Com base nestes resultados, registra-se que, apesar de terem sido adquiridos como animais isogênicos, as colônias descendentes dos mesmos e mantidas nos Biotérios não estão imunes a processos de contaminação genética ao longo do tempo, evidenciando a importância do monitoramento genético contínuo das colônias mantidas nos Biotérios.

Palavras – chave: monitoramento genético, microssatélites, linhagens isogênicas, mutações.

ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the genetic profile of three strains of mice *Mus musculus* (BALB/c, DBA/2 and C57BL/6) created and maintained in two animal facilities (A and B) from Manaus, using microsatellite markers available in databases, for the strains in question. Of 23 loci tested, 10 were used: D1Mit17, D3Mit49, D3Mit86, D5Mit79, D6Mit201, D8Mit4, D9Mit26, D10Mit233, D11Mit41 and DXMit95. It was observed animals with heterozygosity to five loci (D1Mit17, D5Mit79, D8Mit4, D11Mit41, DXMit95) and to two loci were detected alleles not corresponding to the expected sizes (D3Mit49 and D3Mit86), in at least one of the tested strains. Although not expect polymorphism to the strains analyzed, the values of average of the heterozygosity values ranged from 0.05 (strain BALB/c from Institution B) to 0.166 (strain BALB/c from Institution A). Therefore, the presence of heterozygous and new alleles in all searched strains demonstrates that there is genetic variability in these strains. Such polymorphisms may have originated by the accidental cross-overs, mutations, residual heterozygosity or meiotic recombination, resulting in genetic diversity within strains. Based on these results, it is recorded that, despite having been acquired as isogenic animals, the descendants of these colonies kept in animal facilities aren't immune to processes of genetic contamination over time, highlighting the importance of continued genetic monitoring of colonies maintained in animal facilities.

Keywords: genetic monitoring, microsatellites, isogenic strains, mutations.

SUMÁRIO

1. **LISTA DE TABELAS E QUADROS** xi

2. **LISTA DE FIGURAS** xiii

3. **INTRODUÇÃO** 14

3.1 Ciência de animais de laboratório 14

3.2 Linhagens isogênicas 15

3.3 Surgimento das linhagens 15

3.4 Produção de linhagens isogênicas 16

3.5 Importância das linhagens 16

3.6 Problemas de contaminação das linhagens 17

3.7 Metodologias usadas para investigação genética das linhagens 17

3.8 Biotérios e linhagens estudadas 19

4. **HIPÓTESES** 22

5. **OBJETIVOS** 23

5.1 Geral 23

5.2 Específicos 23

6. **MATERIAL E MÉTODOS** 24

6.1 Comitê de Ética 24

6.2 Animais experimentais 24

6.3 Fontes de DNA 25

6.4 Extração de DNA 25

6.5 Análise das amostras de DNA 26

6.6 Reação em cadeia da polimerase (PCR) 26

6.6.1 Seleção dos *primers* 26

6.6.2 Amplificação das amostras de DNA por PCR 28

6.7 Eletroforese em gel de agarose 29

6.8 Teste de acasalamento entre indivíduos de diferentes linhagens isogênicas 29

6.9 Análises dos resultados 30

7. **RESULTADOS** 31

7.1 Instituição A 31

7.1.1 Linhagem BALB/c 31

7.1.2 Linhagem C57BL/6 34

7.1.3 Linhagem DBA/2 36

7.2 Instituição B 37

7.2.1 Linhagem BALB/c 37

7.3 Testes de acasalamento 41

7.3.1 Análise fenotípica 41

7.3.2 Análise genotípica 42

7.4 Análise de Polimorfismo e Diversidade Genética 45

8. **DISCUSSÃO** 47

9. **CONCLUSÃO** 588

10. **CONSIDERAÇÕES FINAIS** 58

11. **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** 599

1. LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1: Linhagens de camundongos *Mus musculus* utilizadas nesta pesquisa oriundas dos Biotérios A e B da cidade de Manaus - AM. 24

Tabela 2: Características dos 23 locos microssatelites escolhidos para amplificação de DNA de *Mus musculus* e sequência dos *primers* correspondentes. 27

Tabela 3: Tamanho estimado dos locos microssatélites para cada linhagem isogênica de *Mus musculus*. 28

Tabela 4: Caracterização dos locos microssatélites amplificados nos indivíduos da linhagem BALB/c de *Mus musculus* oriundos da Instituição A em Manaus, AM. 32

Tabela 5: Caracterização dos locos microssatélites amplificados nos indivíduos da linhagem C57BL/6 de *Mus musculus* oriundos da Instituição A em Manaus, AM. 34

Tabela 6: Caracterização dos locos microssatélites amplificados nos indivíduos da linhagem DBA/2 de *Mus musculus* oriundos da Instituição A em Manaus, AM. 36

Tabela 7: Caracterização dos locos microssatélites amplificados nos indivíduos da linhagem BALB/c de *Mus musculus* oriundos da Instituição B em Manaus, AM. 38

Tabela 8: Perfil genético (M – monomórfico; P – polimórfico) observado nas linhagens de *Mus musculus*, oriundos da Instituição A e B em Manaus-AM, por analise de locos microssatélites. 40

Tabela 9: Relação de tamanho dos alelos microssatélites encontrados nas linhagens de *Mus musculus* oriundas das Instituições A e B. 41

Tabela 10: Análise fenotípica da coloração da pelagem da progênie F1 obtida a partir dos testes de acasalamento propositais realizados entre as linhagens de *Mus musculus* na Instituição A em Manaus – AM. 42

Tabela 11: Genotipagem dos camundongos *Mus musculus* utilizados no Cruzamento 1 realizado no Biotério da Instituição A em Manaus-AM. 43

Tabela 12: Genotipagem dos camundongos *Mus musculus* utilizados no Cruzamento 2 realizado no Biotério da Instituição A em Manaus-AM. 43

Tabela 13: Genotipagem dos camundongos *Mus musculus* utilizados no Cruzamento 3 realizado no Biotério da Instituição A em Manaus-AM.....43

Tabela 14: Genotipagem dos camundongos *Mus musculus* utilizados no Cruzamento 4 realizado no Biotério da Instituição A em Manaus-AM.....45

Tabela 15: Heterozigosidade média observada para os locos microssatélites em cada linhagem de *Mus musculus* das Instituições A e B em Manaus-AM. 46

2. LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Perfil eletroforético dos produtos de PCR para os locos D3Mit49 (A), D5Mit79 (B), D8Mit4 (C) e D11Mit41 (D) da linhagem BALB/c de camundongos *Mus musculus* oriundos da Instituição A, Manaus - AM, em gel de agarose 4% corado com brometo de etidio. 1 a 6: indivíduos analisados; M1: marcador de peso molecular DNA Ladder de 50pb (Fermentas); M2: marcador de peso molecular DNA Ladder de 100pb (Fermentas). 33

Figura 2: Perfil eletroforético dos produtos de PCR para o loco DXMit95 da linhagem C57BL/6 de camundongos *Mus musculus* oriundos da Instituição A, Manaus – AM em gel de agarose 4% corado com brometo de etídio. 1 a 6: indivíduos analisados; M1: marcador de peso molecular DNA Ladder de 50 pb (Fermentas); M2: marcador de peso molecular DNA Ladder de 100 pb (Fermentas). 35

Figura 3: Perfil eletroforético dos produtos de PCR para os locos D3Mit86 (A) e DXMit95 (B) para a linhagem DBA/2 de camundongos *Mus musculus* oriundos da Instituição A, Manaus - AM, em gel de agarose 4% corado com brometo de etídio. 1 a 6: indivíduos analisados; M1: marcador de peso molecular DNA Ladder de 50pb (Fermentas) M2: marcador de peso molecular DNA Ladder de 100pb (Fermentas). 37

Figura 4: Perfil eletroforético dos produtos de PCR para o loco D1Mit17 para a linhagem BALB/c de camundongos *Mus musculus* oriundos da Instituição A, Manaus - AM, em gel de agarose 4% corado com brometo de etídio. 1 a 6: indivíduos analisados; M1: marcador de peso molecular DNA Ladder de 50pb (Fermentas) M2: marcador de peso molecular DNA Ladder de 100pb (Fermentas). 39

Figura 5: Prole (irmãos) de duas ninhadas de *Mus musculus* da Instituição A em Manaus-AM oriundos de cruzamento duplo do casal 3 (Cruzamento 3) apresentando diferença na coloração de pelagem.....42

Figura 6: Genotipagem em gel de agarose 4% do produto de PCR dos animais utilizados no cruzamento 3 para três regiões microssatélites analisadas. A - loco D1Mit17; B - loco D5Mit79; C - D11Mit41; M – Marcador de peso molecular.....44

3. INTRODUÇÃO

3.1 Ciência de animais de laboratório

O desenvolvimento da ciência e da tecnologia referente às áreas biomédicas é baseado em dados obtidos por meio do uso de animais de laboratório. Estes são muito utilizados como modelo animal de doença, para a realização de testes farmacológicos, toxicológicos e na compreensão de patologias que acometem os seres humanos e animais (Festing, 1975; Allen e Cowley, 2003; Aitman et al., 2008; Benton et al., 2011; Blake et al., 2011; Sperling, 2011). Os ratos (*Rattus norvegivus*) e camundongos (*Mus musculus*) são os modelos animais mais utilizados para esses estudos. Isso ocorre devido ao fato de serem animais de pequeno porte, tornando a sua criação e manutenção mais econômica; de possuírem uma alta taxa reprodutiva e um curto período de vida, o que permite estudar processos de doenças em muitos indivíduos e em todas as fases do seu ciclo vital. Além disso, a genética desses animais é bastante conhecida e seu código genético demonstra grande semelhança com o humano (Rivas, 2008; Feijó et al., 2010).

Nos últimos anos, os cientistas têm desenvolvido animais de laboratório como moldes para inúmeras enfermidades que acometem aos humanos e animais (Silva Neto et al., 2005; Chorilli et al., 2007). Dessa forma, tornou-se necessária a criação de uma área, que fosse pluridisciplinar, para desenvolver e padronizar os animais modelo para pesquisa, que é conhecida como “Ciência de Animais de Laboratório”, tendo como um dos principais objetivos a produção de linhagens rigidamente padronizadas (Passos, 1997). Isto somente foi possível devido à boa adaptação de ratos e camundongos a acasalamentos consanguíneos (Rivas, 2008), permitindo a criação de um grande número de linhagens diferentes. Desta forma, é necessário conhecer as características genéticas de cada uma destas linhagens pra escolher qual o modelo mais adequado para a pesquisa a ser realizada. Quanto à estrutura genética, os animais de laboratório são basicamente divididos entre linhagens heterogênicas e linhagens isogênicas (Guénet e Benavides, 2009). As linhagens heterogênicas consistem de populações que possuem elevada variabilidade genética, e assim, são muito úteis em pesquisas nas quais o genótipo heterogênico seja importante, como acontece nas populações de seres humanos. Por outro lado, as linhagens isogênicas compõem o grupo dos organismos cujas características genéticas devem ser padronizadas para utilização em pesquisas.

3.2 Linhagens isogênicas

Os roedores isogênicos consistem em linhagens de populações geneticamente uniformes, onde cada população representa somente uma amostra entre várias formas alélicas que existem nas espécies (Guénet e Benavides, 2009). Segundo Santos (2002) estas linhagens são obtidas por meio de protocolos específicos de reprodução, sendo os endocruzamentos - acasalamentos entre indivíduos que possuem ancestrais comuns, ou seja, indivíduos aparentados – a primeira etapa no estabelecimento destes modelos. Assim sendo, os acasalamentos ininterruptos e sistemáticos, entre irmãos e irmãs por mais de 20 gerações, produzirão os atributos específicos de determinada linhagem isogênica (Caballero et al., 1991). Esses critérios teoricamente asseguram um nível mínimo de isogenia de 98,6%, apresentando uma variação genética menor que 2% na 20° geração tecnicamente designada como "heterozigosidade residual" (Casellas, 2011). As principais características das linhagens isogênicas são: isogenicidade em indivíduos da mesma linhagem, homozigosidade, uniformidade fenotípica e estabilidade genética em longo prazo (Beck et al., 2000). Segundo o banco de dados internacionais para camundongos de laboratório "Mouse Genome Informatics" (MGI), existem aproximadamente 478 linhagens isogênicas de camundongos e 234 de ratos (www.informatics.jax.org/, 2012). Este número aumenta, e muito, se contarmos com as inúmeras linhagens de camundongos e ratos transgênicos e *knockouts* estabelecidas nos últimos tempos (Bressan, 2008; Tanaka et al., 2010)

3.3 Surgimento das linhagens

As linhagens isogênicas surgiram a partir de linhagens heterogênicas, em 1909, quando o pesquisador Clarence Cook Little iniciou a produção de linhagem geneticamente pura a partir de um casal portador de mutações recessivas para genes responsáveis pela herança da cor da pelagem (Chorilli et al., 2007). Dessa forma, nasceu a primeira linhagem consanguínea ou *inbred*, DBA (*Dilute Brown Non-Agouti*), obtida por acasalamentos entre irmãos por 20 ou mais gerações consecutivas (Guénet e Benavides, 2009). Dessa mesma forma, foram obtidos diversos outros tipos de linhagens que acabavam resultando em características fenotípicas diferenciais para cada linhagem.

3.4 Produção de linhagens isogênicas

O processo de produção de linhagens isogênicas para fornecimento começa pelo estabelecimento de três principais colônias: a primeira é a colônia de fundação que consiste em um pequeno número de casais que remontam a um ancestral em comum (Santos, 2002). Esta colônia tem a função de produzir matrizes e de autoperpetuar-se, possibilitando sua própria manutenção (Chorilli et al., 2007). A segunda colônia (expansão) consiste somente de animais consanguíneos, a qual, sempre por acasalamentos monogâmicos, possui a função de ampliar a produção da colônia de fundação e gerar a próxima colônia, chamada de colônia de produção. Esta, por sua vez tem o objetivo de atender a demanda de pesquisa, e os acasalamentos são realizados ao acaso, pois neste caso, os indivíduos já devem ter alcançado seu nível de isogenicidade.

3.5 Importância das linhagens

A história de linhagens isogênicas, por princípio era estritamente ligada ao desenvolvimento de pesquisas com câncer e imunologia (Haldane, 1933; Strong, 1942; Mekada et al., 2009). Porém, com o passar do tempo elas começaram a ser desenvolvidas e apresentadas por pesquisadores para estudos de diferentes tipos de doenças, disfunções e malformações (Silva Neto et al., 2005; Chorilli et al., 2007). A maioria dos experimentos que adota linhagens isogênicas consiste em pesquisas que envolvem fatores genéticos, farmacológicos, fisiológicos, e principalmente imunológicos (Williams et al., 1971; Passos, 1997; Silva, 2006; Souza, 2007), e mesmo aquelas que usam roedores transgênicos, necessitam da existência de linhagens isogênicas para sua produção (Galli-Taliadoros et al., 1995; Ferreira et al., 2005). Portanto, cada linhagem é uma ferramenta importante para o pesquisador, onde já se conhece as características biológicas e predisposições de cada uma (Festing, 1979).

Além de servirem como modelos específicos para doenças, uma das maiores vantagens de trabalhar com linhagens isogênicas é sua uniformidade genética prolongada, o que permite que os experimentos realizados com esses mesmos materiais possam ser reproduzidos de forma independente de tempo e espaço (Silver, 1995). Os camundongos que pertencem à mesma linhagem são homogêneos em cada loco genômico (Benton et al., 2011). Portanto, com esses animais há a possibilidade da eliminação da variabilidade de origem

genética dos bioensaios (Godard e Guénet, 1999), reduzindo a complexidade genômica e logo, os pesquisadores podem investigar em uma genética definida. Além disso, o tipo de respostas experimentais obtidas pode variar em animais de diferentes linhagens, principalmente quando se trata de sistema imune (Williams et al., 1971; Head e Billingham, 1985; Benton et al., 2011). Portanto, o conhecimento do patrimônio genético é fundamental para pesquisas bem fundamentadas que utilizam animais isogênicos.

3.6 Problemas de contaminação das linhagens

Experimentos com camundongos *inbred* são frequentemente reproduzidos em laboratórios diferentes. Isso exige que os animais sejam geneticamente idênticos e que haja harmonização dos procedimentos operacionais (Demers et al., 2006), do ponto de vista genético, ambiental e sanitário. Portanto, supondo que o ambiente e o saneamento dos animais estão rigidamente controlados, qualquer tipo de variação será proveniente do perfil genético nos animais (De Jesús et al., 2011). Essa possibilidade de desvios do perfil genético encontra-se presente quando acontecem mutações nos animais, gerando uma deriva genética na linhagem isogênica; na presença em excesso de heterozigosidade residual, ou até mesmo por imprudências por parte do pesquisador (Massironi et al., 2006), resultando em acasalamentos acidentais entre diferentes linhagens. Estes eventos, se não forem caracterizados e monitorados frequentemente podem levar a perda das características originais para as quais as linhagens foram produzidas (Benavides et al., 2001; Nitzki et al., 2007, Massironi, 2009). Desta forma, enquanto a deriva genética é um evento natural e de difícil controle, as contaminações decorrentes de falha humana poderão ser evitadas por meio de programas de monitoramento genético das colônias.

3.7 Metodologias usadas para programas de monitoramento genético das linhagens

Diante à possibilidade de contaminações, há necessidade de um controle genético sobre a pureza das linhagens, ou seja, de um conjunto de técnicas que nos permita verificar se os animais utilizados ainda conservam as características genéticas originais das linhagens as quais pertencem, ou que não tenham sofrido nenhuma troca ou contaminação genética de outras linhagens via cruzamentos acidentais (Benavides et al., 2001; Guénet e Benavides, 2009; Massironi, 2009). Para isso, existem várias metodologias, que vão desde a análise fenotípica até às moleculares. Um dos primeiros métodos utilizados para investigar a presença

de contaminações genéticas nas linhagens se deu por meio de testes de acasalamentos, onde indivíduos de diferentes linhagens são cruzados e analisados observando se os descendentes possuem a coloração esperada para cada cruzamento. Para tanto, já são mapeados todos os genes que participam da coloração de pelagem das principais linhagens. No entanto, este procedimento acabou-se tornando ultrapassado, devido ao surgimento de técnicas mais confiáveis, informativas e práticas a respeito da presença de contaminações. Depois da fase de investigações realizadas por meio de análises indiretas do genótipo dos animais, os monitoramentos começaram a ser realizados utilizando-se marcadores bioquímicos ou imunológicos, onde o controle genético era frequentemente realizado até cerca de três décadas atrás (Hendersen, 1966; DeLorenzo e Ruddle, 1969; Weigert e Riblet, 1978).

No entanto, dois grandes inconvenientes apareceram para estes marcadores: em primeiro lugar, há um número limitado deles; e em segundo, estes marcadores apresentam níveis muito baixos de polimorfismo (Silver, 1995) tornando-os insuficientes para detecção de contaminações genéticas em linhagens isogênicas (Benavides et al., 2001). Além disto, as técnicas para uso destes marcadores são muito laboriosas e demoradas e algumas necessitam que os animais sejam submetidos à eutanásia para coleta das amostras (Bender et al., 1984).

Com o sequenciamento do genoma de *Rattus norvegicus* (rato) (Aitman et al., 2008) e de *Mus musculus* (camundongo) (Yoshiki e Moriwaki, 2006) os estudos genéticos se tornaram mais viáveis (Petersen et al., 2005; Blake et al., 2011). Assim, os métodos de controle genético utilizando marcadores moleculares vêm se ampliando com o intuito de fornecer, em curto prazo, grande número de informações genéticas sobre as linhagens. As técnicas moleculares que tem apresentado melhores resultados na diferenciação de linhagens são aquelas que usam marcadores microssatélites com sequências específicas (Benavides et al., 2001; Tolwani et al., 2002; Bryda e Riley, 2008).

Marcadores microssatélites (também denominados SSLPs - *Simple Sequence Length Polymorphisms;* ou SSRs - *Simple Sequence Repeats*; ou STRs - *Short Tandem Repeats*) são regiões do DNA contendo di-, tri- ou até hexanucleotídeos repetidos que são encontrados aleatoriamente e abundantemente no genoma (Stallings et al., 1991). O número dessas repetições é altamente polimórfico entre diferentes linhagens de camundongos, o que permite a utilização de marcadores microssatélites para a distinção de fragmentos de DNA derivados de linhagens diferentes (Mashimo et al., 2006). Possibilita também o estudo de uma ampla

variedade de enfermidades pela identificação no cromossomo de regiões envolvidas com doenças como diabetes, hipertensão, plasmocitomas, esclerose múltipla, câncer e outras desordens genéticas (Passos, 1997; Li et al., 2002).

Segundo Roder e colaboradores (1995), os marcadores microssatélites são muito importantes para mapeamento genético de espécies com baixo polimorfismo intra-específico, como a maioria das espécies endogâmicas. Assim, além da utilização no monitoramento de linhagens, também têm sido utilizados na identificação de genes e a sua associação com as outras espécies (Benavides et al., 2000; Bryda e Riley, 2008). Os locos microssatélites podem ser amplificados por reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), utilizando-se *primers* que flanqueiam as regiões repetitivas. Desta forma, permitem a identificação e diferenciação entre os indivíduos/linhagens com base no polimorfismo de tamanho de fragmento resultante da PCR de cada loco microssatélite. Ou seja, é possível determinar os genótipos por analise em gel de agarose dos fragmentos obtidos (Massironi, 2009).

Assim, os marcadores microssatélites vem sendo apontados como uma das classes de marcadores genéticos mais informativos para testes genéticos de animais de laboratório devido ao alto nível de polimorfismo apresentado, seus abundantes locos, praticidade e estabilidade na herança mendeliana codominante (Shang et al., 2009).

A literatura registra vários marcadores microssatélites disponíveis para estudos com linhagens de camundongos e ratos. Segundo o banco de dados de microssatélites do Japão MMDBJ - *Mouse Microsatellite Database of Japan* (disponível em www.shigen.nig.ac.jp), cerca de 7.000 marcadores microssatélites já foram identificados e caracterizados para as linhagens de camundongos, enquanto que 48 linhagens de ratos têm sido caracterizadas com cerca de 5.000 SSLP (Bryda e Riley, 2008).

3.8 Biotérios e linhagens estudadas

Segundo a Resolução Normativa N° 3, de 14 de dezembro de 2011, do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal), disponível em www.usjt.br/prppg/ceua/pdf/resolucao_normativa_n3_14_dezembro_2011.pdf; Biotérios são locais onde são criados ou mantidos animais para serem usados em ensino ou pesquisa científica, que possua controle das condições ambientais nutricionais ou sanitárias.

Portanto, para o estudo e a implantação de técnicas de controles genéticos em animais utilizados em pesquisas que envolvam esta área, é necessário que haja a presença de instalações destinadas a produzir e manter animais de laboratório, que atendam as exigências fisiológicas dos animais que ali são criados ou mantidos, proporcionando-lhes bem-estar e saúde para que possam se desenvolver e reproduzir, bem como responder satisfatoriamente aos testes em que forem utilizados (Laboratório de Controle Sanitário Animal - LCSA, 2010). Desta forma, os Biotérios, possuem papel fundamental no fornecimento e desenvolvimento de modelos animais para pesquisas orientadas à saúde pública. Cabe a eles a disponibilização de animais dentro de padrões genéticos e sanitários, de forma a evitar variações de resultados que comprometam as investigações.

Segundo Politi e colaboradores (2008), os primeiros artigos indicando a necessidade de uma padronização das condições do Bioterismo no Brasil são da década de 1940, e foram realizados por José Ribeiro do Valle e José Leal Prado. Entretanto, conforme registrado em publicação internacional três décadas depois, as condições dos biotérios brasileiros eram ainda péssimas e comprometiam tanto a qualidade dos animais utilizados na pesquisa científica nacional, como principalmente os resultados experimentais obtidos, uma vez que era evidente a impossibilidade de reprodutibilidade experimental (Rosekranz et al., 1978). Tal problemática repercutiu no planejamento de atividades relacionadas a Biotérios, tendo o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), a Academia Brasileira de Ciências (ABC) e a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP, 2007) como órgãos centrais nas primeiras discussões. Estes adotaram parâmetros de certificação internacional para implantação nos Biotérios nacionais a fim de consolidar centros de Bioterismo no país (Centro de Gestão e Estudos Estratégicos - CGEE, 2003).

Os Biotérios selecionados para os estudos de caracterização genética deste projeto (sob aprovação dos Comitês de Ética n° 112/2012 e n° 071/2012) pertencem a duas instituições (A e B) na cidade de Manaus, as quais mantêm animais do tipo convencional como ratos (*Rattus norvegicus*) das linhagens Lewis e Wistar, camundongos (*Mus musculus*) das linhagens DBA/2, C57BL/6, BALB/c e Swiss; e hamster (*Mesocricetus auratus*) sírio. O projeto foi proposto no intuito de estudar as linhagens de camundongos destes Biotérios, as quais são muito utilizadas em pesquisas científicas que requerem a originalidade das características genéticas presumidas.

Apesar de estarem em andamento os procedimentos padrões para o sistema de cruzamento dessas linhagens em ambos os Biotérios e não haver registros de acontecimentos que apontem a presença de animais contaminados, esse trabalho se propôs a investigar a condição genética dos animais, a fim de testar se sua integridade genética tem sido preservada ao longo do tempo de manutenção dos mesmos. Portanto, com a disponibilidade de marcadores moleculares específicos e frente à necessidade de pesquisas sobre o controle genético das linhagens isogênicas em Biotérios, este trabalho empregou marcadores microssatélites para investigar a isogenia de linhagens de camundongos mantidas em dois Biotérios da cidade de Manaus-AM.

4. HIPÓTESES

H0 – As linhagens de camundongos *Mus musculus* mantidas em dois Biotérios da cidade de Manaus permanecem isogênicas.

H1 – As linhagens de camundongos *Mus musculus* mantidas em dois Biotérios da cidade de Manaus não permanecem isogênicas.

5. OBJETIVOS

5.1 Geral

Investigar a isogenia de linhagens de camundongos *Mus musculus* mantidas em dois Biotérios de pesquisa da cidade de Manaus, Amazonas, por meio de marcadores microssatélites.

5.2 Específicos

Otimizar a amplificação de locos microssatélites em três linhagens de camundongos (BALB/c, C57BL/6 e DBA/2).

Confirmar, utilizando o método da PCR clássica, a isogenia das linhagens alojadas nos Biotérios pesquisados.

Realizar testes de acasalamentos programados com o intuito de induzir contaminações genéticas entre indivíduos de diferentes linhagens e analisar geneticamente as gerações Parental e F1.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Comitê de Ética

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (CEUA), sob o número 071/2012 e também pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEUA), sob o número 112/2012, das duas Instituições do estudo. De posse destas aprovações, dias 25.04.2013 e 11.06.2013, respectivamente, os animais foram liberados pelos Biotérios, cerca de um mês depois, para execução do projeto.

6.2 Animais experimentais

Um total de três linhagens de camundongos *Mus musculus*, oriundos de dois Biotérios (A e B) pertencentes a instituições de pesquisa localizadas na cidade de Manaus – AM (Tabela 1) foram utilizadas nos experimentos.

Tabela 1: Linhagens de camundongos *Mus musculus* utilizadas nesta pesquisa oriundas dos Biotérios A e B da cidade de Manaus - AM.

Linhagem	Nº indivíduos analisados	Biotério	Ano de obtenção pelo Biotério
BALB/c	6	A	2010
	6	B	2012
C57BL/6	6	A	2008
DBA/2	6	A	2010

Três linhagens de camundongos *Mus musculus* (BALB/c, C57BL/6, DBA/2 – isogênicas) oriundas do Biotério A, tem se mantido desde os anos de 2008 (linhagem C57BL/6) e 2010 (linhagens BALB/c e DBA/2). Estas foram adquiridas inicialmente por Biotérios brasileiros localizados em Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro, respectivamente e repassadas aos Biotérios em Manaus (Moroni, F. T., comunicação pessoal). A linhagem BALB/c do Biotério B foi adquirida em 2012 diretamente de empresa produtora de linhagens isogênicas, porém, os animais foram adquiridos ainda antes da 20ª geração que leva à isogenia pelo biotério, assim como a coleta para o presente estudo. Foram selecionados

por amostragem aleatória, para os procedimentos, seis indivíduos de cada linhagem citada, provenientes da colônia de produção.

Nos Biotérios, essas linhagens são mantidas por acasalamentos entre irmãos sob condições de barreiras físicas e vem sendo utilizadas por pesquisadores internos e externos às instituições. Todos os experimentos realizados nesses animais foram conduzidos de acordo com os princípios éticos na experimentação animal estabelecido pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

6.3 Fontes de DNA

Os seis camundongos de cada linhagem selecionados aleatoriamente foram anestesiados com xilazina (50 mg/Kg) associada à cetamina 50 mg/kg (Rogero et al., 2010). A partir do momento em que os animais perdiam o reflexo em resposta a estímulos de dor, foi realizada a coleta da ponta da cauda destes animais, com lâminas de bisturis estéreis. Aproximadamente 1,0 cm de cauda foi utilizada como fonte de material para a extração do DNA genômico individual.

6.4 Extração de DNA

Para realizar a extração do DNA individual das amostras de cada linhagem utilizou-se o protocolo de controle de qualidade genética de camundongos consanguíneos, otimizado a partir do método com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (Wolff e Gemmill, 1997), e fornecido por Fernando Benavides / Universidade do Estado do Texas (informação pessoal).

As amostras das caudas foram colocadas individualmente em 400 µL de tampão de lise (50mM Tris, pH 8.0, 1 mM EDTA, 100mM NaCl), 40 µL de SDS 10% e 20 µL da solução de proteinase K (10 $mg.mL^{-1}$). As amostras foram misturadas por inversão manual e a mistura incubada *overnight* a 37 °C em banho termostatizado. Um volume de 400 µL da solução de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) foi adicionado em cada microtubo, os quais foram misturados por inversão manual durante três minutos, e então submetidos a centrifugação durante 15 minutos a 4.000 rpm em 4 °C. Após a centrifugação, recuperou-se a fase superior da solução presente transferindo para novo tubo, enquanto que a fase inferior foi descartada. Foi adicionado 1 V de clorofórmio e a solução foi homogeneizada manualmente

por 3 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas durante 15 minutos, 4.000 rpm, 4 °C. A fase superior foi recuperada. Foi acrescentado em cada tubo 2 V de etanol absoluto e 1/10 do volume de NaCl 3M. Na sequência, a solução foi centrifugada por 30 minutos a 12.000 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi descartado por inversão e o *pellet* lavado com 1 mL de etanol 70%, seguido de centrifugação por 30 minutos a 12.000 rpm, 4 °C. O etanol foi retirado por inversão, e os microtubos foram invertidos e colocados sobre papel absorvente por 30 minutos, a temperatura ambiente, para secar o DNA precipitado. Os *pellets* resultantes das amostras de DNA das linhagens foram ressuspensos em 500 µL de água destilada estéril e as soluções foram armazenadas a -20 ºC até o uso.

6.5 Análise das amostras de DNA

A estimativa da concentração do DNA extraído foi determinada mediante quantificação por espectrofotometria a 260nm em Nanodrop 2000 e a integridade do DNA foi avaliada em gel de agarose 0,8%, corado com gelRed (Biotium).

6.6 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

6.6.1 Seleção dos *primers*

Foram escolhidos vinte e três locos microssatélites, a fim de confirmar molecularmente a isogenia das linhagens (Tabela 2), baseando-se na cobertura ampla do genoma, no grau de polimorfismo estimado, nos locos usados por Passos (1997); Benavides et al.(2000, 2001); Tolwani et al. (2002); Nitzki et al. (2007); Guénet e Benavides (2009); De Jesús et al. (2011) e nas informações do Banco de dados “Mouse Genome Informatics (MGI)” disponíveis no site http://www.informatics.jax.org, de onde foram adquiridas as sequências dos *primers*. Ensaios preliminares de otimização de amplificação dos locos por PCR selecionaram 10 locos que para as linhagens de camundongos analisadas estão distribuídos nos cromossomos 1, 3, 5, 6, 8, 9, 10, 11 e X. Esses marcadores apresentam sequências de nucleotídeos definidas e produtos de amplificação com diferentes tamanhos de fragmentos (Tabela 3).

Tabela 2: Locos microssatelites escolhidos para amplificação de DNA de *Mus musculus* e sequência dos *primers* correspondentes.

Loco	Localização do loco (Nº do cromossomo)	Sequência do *Primer*
D1Mit17	1	GTGTCTGCCTTTGCACCTTT CTGCTGTCTTTCCATCCACA
Crp	1	AGAATCTGACTTACCCATGGT GAGGGAGAAGAATTATGTCTG
D2Mit75	2	TCAGCATGTGGATGAATACACA AACTTTTTAAAAACTACGAGCGTG
D3Mit86	3	TGCTCAACATAAAATGTCTGGC AAGCACAGAAACATCTCTCACG
D3Mit49	3	CTTTTCTCGCCCCACTTTC TCCTTTTAGTTTTTGATCCTCTGG
D4Mit15	4	AGGAATACTGAATGTGGACTTTCC TCCCTTGATTAACAGAAGACCTG
D5Mit79	5	ATGCTAAAAAAAAAGGCTAAGTTCA CAGTAAATAGCAGGTGTTCATGG
D6Mit201	6	TGCTTCCTCTCTGCTGTAAGC AACTAAGGCCAGTACTGAAAAGTACA
Ngfg	7	CTCCACATGTGTATGTGTATG ATGGAGGCCGAAGAAAGAATC
D8Mit4	8	CCAACTCATCCCCAAAGGTA GTATGTTCAAGGCTGGGCAT
D9Mit26	9	ATTGCATAACACCCCCACAT CAGTGCTTAACTGCTCAAATGC
D10Mit233	10	GTGCTTTATATTGGAGATCATCACA GTCCCGAATTTCACATACATAGC
D11Mit41	11	CTGCTAAAGTGGGGTTAAATGC CGACTGAGCAAGTTGTATTTCTG
Igh-V	12	ACATGGTAATTTATGGGCAA CTGGATACCTGCAATAGTAGA
Igh	12	TATGAAGATGTGGTTAAACTG GGTCATACACATCTGCTAATC
D13Mit3	13	TCAGGCTCATCCCAGATACC TTTTGCAGAGAACACACACC
Plau	14	TGCTGGCTAGGAATAAACAGA AGGGAATTCATGTTCAGGATA
D15Mit34	15	TGGACAACCATTTTGGACAA CTTTCTGTCAGGCATCACCA
D16Mit5	16	CGGGGATCATCCCTAAAAAC TCCCCAATTCCTCTTGTGTC
D17Mit16	17	CCAGAAGACAGCATTCCACA GTATGTCAGGGCTAGTTGACAGG
D18Mit110	18	GGGAGCCGAATTAACACAAA AACCAAAAACCTTCAAGATAAACA
D19Mit119	19	CACCCACATACCTTGATT CTCTCTTTATCTCTCCTCTCTCT
DXMit95	X	CTGTCAATCTAATTCTCTATGTCTGTG CTTTCCTGGGTGGCAGTG

Fonte: *Rat Genome Database* (RGD) e *Mouse Genome Informatics* (MGI) nos *sites* http://rgd.mcw.edu e http://www.informatics.jax.org

Tabela 3: Tamanho estimado dos produtos da PCR dos locos microssatélites para as linhagens avaliadas.

Locos	Linhagens		
	Balb/c	**C57Black**	**DBA**
D1Mit17	176 pb	170 pb	174 pb
Crp	----------	95 pb	----------
D2Mit75	106 pb	112 pb	16 pb
D3Mit49	148 pb	128 pb	148 pb
D3Mit86	162 pb	154 pb	146 pb
D4Mit15	329 pb	279 pb	279 pb
D5Mit79	136 pb	106 pb	144 pb
D6Mit201	116 pb	148 pb	106 pb
Ngfg	140 pb	145 pb	157 pb
D8Mit4	200 pb	157 pb	195 pb
D9Mit26	224 pb	218 pb	230 pb
D10Mit233	110 pb	130 pb	108 pb
D11Mit41	178 pb	136 pb	166 pb
Igh-V	165 pb	195 pb	162 pb
Igh	----------	----------	----------
D13Mit3	188 pb	159 pb	196 pb
Plau	190 pb	182 pb	201 pb
D15Mit34	192 pb	148 pb	178 pb
D16Mit5	132 pb	156 pb	132 pb
D17Mit16	106 pb	118 pb	106 pb
D18Mit110	133 pb	149 pb	153 pb
D19Mit119	283 pb	265 pb	276 pb
DXMit95	151 pb	151 pb	137 pb

Fonte: *Rat Genome Database* (RGD) e *Mouse Genome Informatics* (MGI) nos *sites* http://rgd.mcw.edu e http://www.informatics.jax.org.

6.6.2 Amplificação das amostras de DNA por PCR

Para a otimização da amplificação dos locos pela técnica PCR, foram consideradas as seguintes condições de reação: 90 a 100ng da amostra de DNA, 1.5 mM de cloreto de magnésio, 1X para o tampão de reação da enzima (100mM de tampão Tris-HCl pH 8.4, 500mM de KCl e 1% de Triton X-100), 0.25 mM de dNTPs, 0.2 pMol/µL de cada *primer* e 1.5U/µL da enzima *Taq* DNA polimerase e água para completar um volume final de 25 µL. Os tubos foram colocados no termociclador gradiente ESCO Swift MaxProe foram iniciados os ciclos de amplificação das amostras. As condições dos ciclos da PCR utilizadas foram de: um ciclo de 94 °C por 4 minutos para desnaturação inicial seguido de 35 ciclos de 94 °C por

45 segundos, 54 a 58 °C (dependendo do *primer*) por 45 segundos e 72°C por 30 segundos; seguido por incubação final a 72 °C durante 7 minutos.

6.7 Eletroforese em gel de agarose

Depois de realizada a PCR, os produtos foram analisados em eletroforese em gel de agarose a 4%, tampão TBE 1X pH 8,2 e corado com brometo de etídio, na presença de marcador de peso molecular de DNA Ladder de 50 pb e 100 pb (Fermentas, Life Sciences). As corridas de eletroforese foram realizadas a 100V durante 4 horas e as bandas foram visualizadas em com auxilio de transiluminador UV em fotodocumentador (Gimaco, Major Science). Os pesos moleculares das amostras analisadas foram calculados de acordo com o manual do aluno de biologia (disponível em http://depts.noctrl.edu/biology/resource/handbook.htm), onde se obteve uma estimativa da quantidade de pares de base em comparação com a migração do marcador molecular de DNA Ladder de 50 pb ou 100 pb. O perfil de bandas foi comparado aos tamanhos esperados (Tabela 3).

6.8 Teste de acasalamento entre indivíduos de diferentes linhagens isogênicas

A fim de induzir contaminações genéticas foram realizados testes de acasalamentos programados entre indivíduos (obtidos de gaiolas estoques) das linhagens de camundongos BALB/c e C57BL/6 do Instituto A (Quadro 1), e analisadas as gerações Parental e F1. Após a amplificação dos locos, comparou-se o padrão de bandas apresentados para os parentais e sua progênie F1 (híbridos). Os indivíduos também foram analisados quanto ao padrão de pigmentação da pelagem.

Cruzamento 1		Cruzamento 2	
♀ X	♂	♀ X	♂
Fêmea A BALB/c	Macho A C57BL/6	Fêmea B BALB/c	Macho B C57BL/6
Cruzamento 3		**Cruzamento 4**	
♀ X	♂	♀ X	♂
Fêmea C C57BL/6	Macho C BALB/c	Fêmea D C57BL/6	Macho C BALB/c

Quadro 1: Cruzamentos induzidos entre camundongos *Mus musculus* das linhagens BALB/c e C57BL/6 mantidos no Biotério do Instituto A.

O mesmo macho foi utilizado nos cruzamentos 3 e 4. No cruzamento 3 ocorreu, de forma inesperada, o aproveitamento do cio pós-parto, onde a fêmea cruzou novamente logo após o parto de sua primeira ninhada, tornando-a prenha mesmo em período de lactação.

Os casais colocados para acasalamento foram observados diariamente até o nascimento e desmame da progênie. Em seguida, foi realizada a coleta do material de todos os animais do teste de acasalamento para a realização da análise genotípica, conforme os itens 6.2 a 6.7. Neste caso, foram utilizados os três locos microssatélites que apresentaram melhor amplificação durante a otimização a fim de analisar os parentais e progênie: D1Mit17, D5Mit79 e D11Mit41.

6.9 Análises dos resultados

A genotipagem dos indivíduos de cada linhagem foi realizada por análise direta do padrão de bandas resultante dos géis para cada loco microssatélite. Os dados foram anotados em planilhas Excell para confirmação ou não da isogenia de cada indivíduo por linhagem de

origem assim como de possíveis contaminações. Ainda, foram estabelecidos os perfis dos híbridos resultantes dos ensaios de cruzamentos.

7. RESULTADOS

O protocolo de extração de DNA apresentou boa qualidade e bom rendimento, sendo que a quantidade média de DNA obtida das amostras individuais foi de 49,42 ng/µL, variando de 29 a 93 ng/µL.

Dos 23 locos microssatélites testados para amplificação de DNA das linhagens de *Mus musculus*, 10 foram escolhidos por apresentarem amplificação positiva e de boa qualidade para todos os indivíduos das linhagens, a saber: locos D1Mit17, D3Mi49, D3Mit86, D5Mit79, D6Mit201, D8Mi74, D9Mit26, D10Mit233, D11Mit41 e DXMIT95. Os outros locos foram descartados da analise, pois não amplificaram em nenhum individuo (locos Crp, D2Mit75, Ngfg, Igh, D13Mit3, D15Mit34, D16Mit5, D17Mit16, D18Mit110 e D19Mit119) ou amplificaram parcialmente as amostras (locos D4Mit15, Igh-V e Plau).

A genotipagem dos indivíduos de cada linhagem foi possível e se registrou que em todas as três linhagens consideradas isogênicas foram encontrados locos heterozigotos e, ainda, em duas observaram-se alelos com tamanho diferente do esperado.

Os resultados observados em cada linhagem serão descritos a seguir.

7.1 Instituição A

7.1.1 Linhagem BALB/c

Para a linhagem BALB/c observaram-se indivíduos heterozigotos para três locos (Tabela 4).

Tabela 4: Caracterização dos locos microssatélites amplificados nos indivíduos da linhagem BALB/c de *Mus musculus* oriundos da Instituição A em Manaus, AM.

Locos	Nº de alelos	Tamanho alélico esperado (pb)*	Tamanho alélico observado (pb)*	Condição Genética
D1Mit17	1	176	176	Monomórfico
D3Mit86	1	162	162	
D3Mit49	1	148	114	
D5Mit79	2	136	136 e 147	Polimórfico
D6Mit201	1	116	116	Monomórfico
D8Mit4	2	200	200 e 219	Polimórfico
D9Mit26	1	224	224	Monomórfico
D10Mit233	1	110	110	
D11Mit41	2	178	139 e 178	Polimórfico
DXMit95	1	151	151	Monomórfico

*pb = pares de bases

Não foram observados polimorfismos para os locos microssatélites D1Mit17, D3Mit49, D3Mit86, D6Mit201, D9Mit26, D10Mit233 e DXMit95, sendo todos os indivíduos homozigotos. No entanto, para o loco microssatélite D3Mit49 foi encontrado alelo em homozigose, porém, menor do que o tamanho esperado (Figura 1-A).

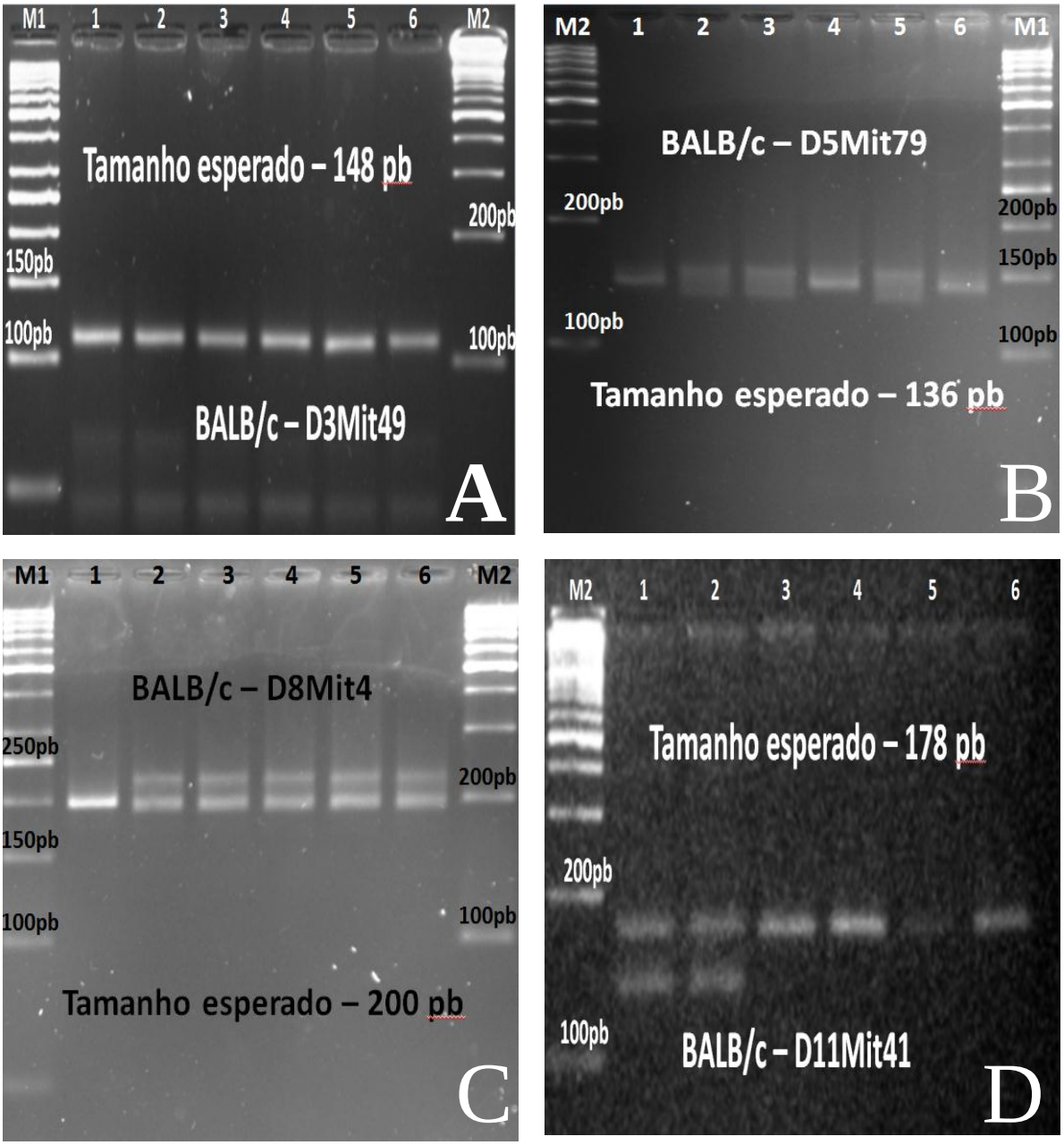

Figura 1: Perfil eletroforético dos produtos de PCR para os locos D3Mit49 (A), D5Mit79 (B), D8Mit4 (C) e D11Mit41 (D) da linhagem BALB/c de camundongos *Mus musculus* oriundos da Instituição A, Manaus - AM, em gel de agarose 4% corado com brometo de etidio. 1 a 6: indivíduos analisados; M1: marcador de peso molecular DNA Ladder de 50pb (Fermentas); M2: marcador de peso molecular DNA Ladder de 100pb (Fermentas).

Registrou-se polimorfismo para os locos microssatélites D5Mit79, D8Mit4 e D11Mit41 (Figura 1 - B, C e D) no conjunto de amostras analisadas. Observaram-se indivíduos homozigotos para estas regiões microssatélites, apresentando o tamanho molecular esperado, mas também indivíduos heterozigotos, indicando a existência de alelos de diferentes

tamanhos. No loco microssatélite D5Mit79 observaram-se alelos de diferentes tamanhos, os quais apresentaram um alelo maior (de 147 pb) do que o esperado (de 136 pb), para três (50%) dos seis indivíduos analisados. Para o loco D8Mit4, cinco (83 %) dos seis indivíduos foram genotipados como heterozigotos e para o loco D11Mit41 dois (33%) de seis indivíduos também eram heterozigotos. Portanto, registrou-se a presença de novos alelos e de heterozigose para esta linhagem em mais de um loco microssatélite.

7.1.2 Linhagem C57BL/6

Para a linhagem C57BL/6 observou-se apenas um loco polimórfico (Tabela 5) sendo os outros oito monomórficos.

Tabela 5: Caracterização dos locos microssatélites amplificados nos indivíduos da linhagem C57BL/6 de *Mus musculus* oriundos da Instituição A em Manaus, AM.

Locos	Nº de alelos	Tamanho alélico esperado (pb)*	Tamanho alélico observado (pb)*	Condição Genética
D1Mit17	1	170	170	Monomórfico
D3Mit86	1	154	154	
D3Mit49	1	128	128	
D5Mit79	1	106	106	
D6Mit201	1	148	148	
D8Mit4	1	157	157	
D9Mit26	1	218	218	
D10Mit233	1	130	130	
D11Mit41	1	136	136	
DXMit95	2	151	174 e 151	Polimórfico

*pb = pares de base.

Os locos microssatélites D1Mit17, D3Mit86, D3Mit49, D5Mit79, D6Mit201, D8Mit4, D9Mit26, D10Mit233 e D11Mit41 se apresentaram monomórficos e monoalélicos em todos os indivíduos analisados desta linhagem. O loco DXMit95 resultou em genótipos heterozigotos para todos os indivíduos analisados (Figura 2).

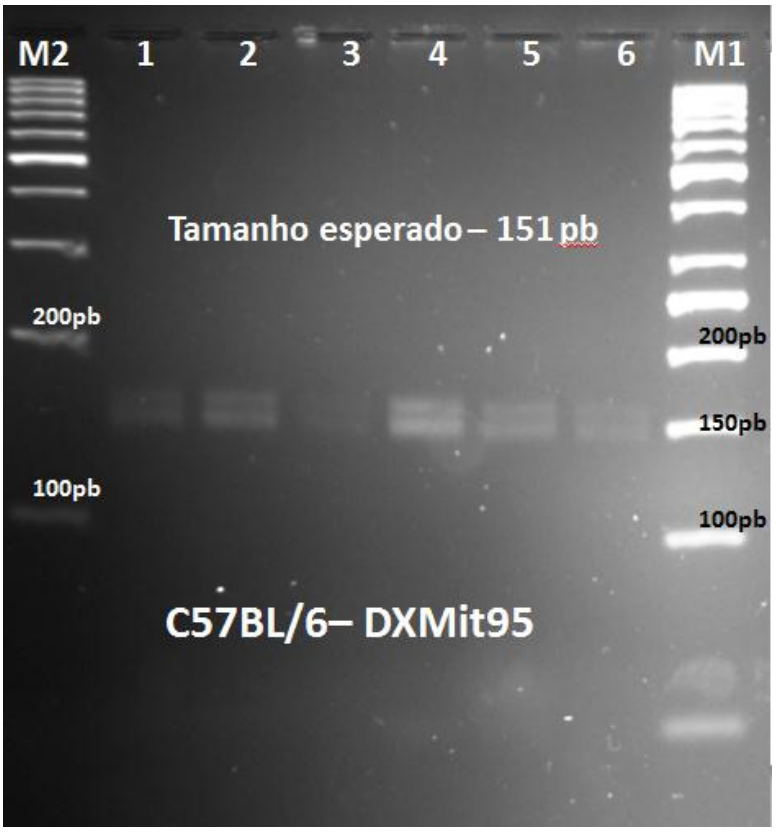

Figura 2: Perfil eletroforético dos produtos de PCR para o loco DXMit95 da linhagem C57BL/6 de camundongos *Mus musculus* oriundos da Instituição A, Manaus – AM em gel de agarose 4% corado com brometo de etídio. 1 a 6: indivíduos analisados; M1: marcador de peso molecular DNA Ladder de 50 pb (Fermentas); M2: marcador de peso molecular DNA Ladder de 100 pb (Fermentas).

7.1.3 Linhagem DBA/2

Assim como para a linhagem C57BL/6, a maioria dos locos microssatélites analisados para a linhagem DBA/2 foram monomórficos. Somente o loco microssatélite DXMit95 apresentou polimorfismo sendo todos os indivíduos heterozigotos (Figura 3-B), enquanto que para os outros locos, todos os indivíduos apresentaram genótipo homozigoto (Tabela 6). Dentre os genótipos homozigotos, o tamanho do alelo encontrado (168 pb) no loco D3Mit86 não correspondeu ao tamanho esperado (146 pb) para esta linhagem (Figura 3-A).

Tabela 6: Caracterização dos locos microssatélites amplificados nos indivíduos da linhagem DBA/2 de *Mus musculus* oriundos da Instituição A em Manaus, AM.

Locos	Nº de alelos	Tamanho alélico esperado (pb)*	Tamanho alélico observado (pb)*	Condição Genética
D1Mit17	1	174	174	Monomórfico
D3Mit49	1	148	148	
D3Mit86	1	146	168	
D5Mit79	1	144	144	
D6Mit201	1	106	106	
D8Mit4	1	195	195	
D9Mit26	1	230	230	
D10Mit233	1	108	108	
D11Mit41	1	166	166	
DXMit95	2	137	160 e 137	Polimórfico

*pb = pares de base.

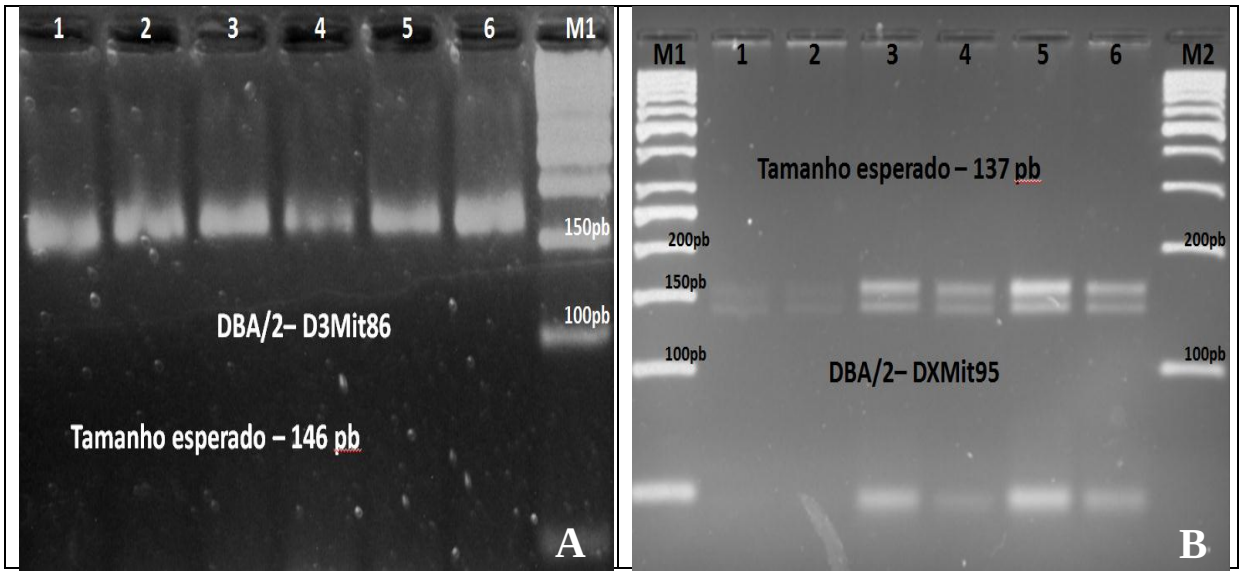

Figura 3: Perfil eletroforético dos produtos de PCR para os locos D3Mit86 (A) e DXMit95 (B) para a linhagem DBA/2 de camundongos *Mus musculus* oriundos da Instituição A, Manaus - AM, em gel de agarose 4% corado com brometo de etídio. 1 a 6: indivíduos analisados; M1: marcador de peso molecular DNA Ladder de 50pb (Fermentas) M2: marcador de peso molecular DNA Ladder de 100pb (Fermentas).

7.2 Instituição B

7.2.1 Linhagem BALB/c

Dentre os dez locos microssatélites analisados para os animais oriundos da Instituição B, nove (locos D3Mit86, D3Mit49, D5Mit79, D8Mit4, D10Mit233 e D11Mit41) foram monomórficos e homozigotos correspondendo ao perfil genético esperado para estes animais (Tabela 7).

Tabela 7: Caracterização dos locos microssatélites amplificados nos indivíduos da linhagem BALB/c de *Mus musculus* oriundos da Instituição B em Manaus, AM.

Locos	Nº de alelos	Tamanho alélico esperado (pb)*	Tamanho alélico encontrado (pb)*	Condição Genética
D1Mit17	2	176	176, 145	Polimórfico
D3Mit86	1	162	162	Monomórfico
D3Mit49	1	148	148	
D5Mit79	1	136	136	
D6Mit201	1	116	116	
D8Mit4	1	200	200	
D9Mit26	1	224	224	
D10Mit233	1	110	110	
D11Mit41	1	178	178	
DXMit95	1	151	151	

*pb = pares de base.

Detectou-se também a presença de polimorfismo para o microssatélite D1Mit17 na análise dos genótipos dos animais. Apesar de ser observado individuos homozigotos com o tamanho esperado para este loco (176pb), também foi verificado a presença de três indivíduos heterozigotos, com os alelos 176pb e 145pb (Figura 4).

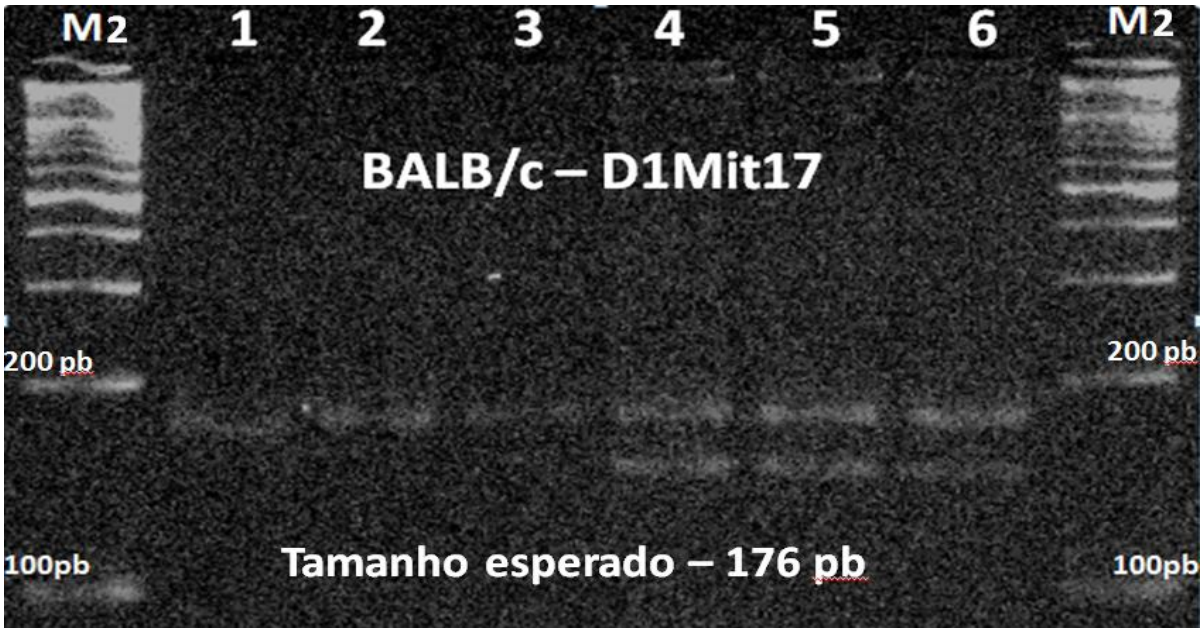

Figura 4: Perfil eletroforético dos produtos dePCR para o loco D1Mit17 para a linhagem BALB/c de camundongos *Mus musculus* oriundos da Instituição A, Manaus - AM, em gel de agarose 4% corado com brometo de etídio. 1 a 6: indivíduos analisados; M1: marcador de peso molecular DNA Ladder de 50pb (Fermentas) M2: marcador de peso molecular DNA Ladder de 100pb (Fermentas).

Em geral, as três linhagens analisadas (BALB/c; C57BL/6 e DBA/2) para as Instituições A e B apresentaram polimorfismo (Tabela 8).

Tabela 8: Perfil genético (M – monomórfico; P – polimórfico) observado nas linhagens de *Mus musculus*, oriundos da Instituição A e B em Manaus-AM, por analise de locos microssatélites.

Locos	Cromossomo	Instituição A			Instituição B
		BALB/c	C57Black	DBA2	BALB/c
D1Mit17	1	M	M	M	P (50%)
D3Mit49	3	P (100%)	M	M	M
D3Mit86	3	M	M	P (100%)	M
D5Mit79	5	P (50%)	M	M	M
D6Mit201	6	M	M	M	M
D8Mit4	8	P (83%)	M	M	M
D9Mit26	9	M	M	M	M
D10Mit233	10	M	M	M	M
D11Mit41	11	P (33%)	M	M	M
DXMit95	X	M	P (100%)	P (100%)	M

Em relação aos tamanhos relativos dos alelos, para os locos analisados, a linhagem BALB/c do Instituto A, na análise do loco microssatélite D3Mit49, e DBA/2 com o loco D3Mit86, não obtiveram resultados congruentes com os tamanhos padronizados para estas. Pois, BALB/c do Biotério A deveria apresentar um tamanho molecular igual a linhagem BALB/c do Biotério B; e DBA/2, deveria ter o menor tamanho entre as linhagens analisadas para este loco.

Tabela 9: Relação de tamanho dos alelos microssatélites encontrados nas linhagens de *Mus musculus* oriundas das Instituições A e B.

Marcador	Ordem decrescente de tamanho alélico (peso molecular) detectado nas linhagens
D1Mit17	BALB/c (A) = BALB/c (B) > DBA/2 (A) > C57BL/6 (A)
D3Mit49	BALB/c/ (B) = DBA/2 (A) > C57BL/6 (A) > BALB/c/ (A)*
D3Mit86	DBA/2 (A)** > BALB/c (A) = BALB/c (A) > C57BL/6 (A)
D5Mit79	DBA/2 (A) > BALB/c (A) = BALB/c (B) > C57BL/6 (A)
D6Mit201	C57BL/6 (A) > BALB/c (A) = BALB/c (A) > DBA/2 (A)
D8Mit4	BALB/c (A) = BALB/c (B) > DBA/2 (A) > C57BL/6 (A)
D9Mit26	DBA/2 (A) > BALB/c (A) = BALB/c (B) > C57BL/6 (A)
D10Mit233	C57BL/6 (A) > BALB/c (A) = BALB/c (B) > DBA/2 (A)
D11Mit41	BALB/c (A) = BALB/c (B) > DBA/2 (A) > C57BL/6 (A)
DXMit95	BALB/c (A) = BALB/c (B) = C57BL/6 (A) > DBA/2 (A)

***** Linhagem com alelo de tamanho menor que o esperado. ** Linhagem com alelo maior do que o esperado.

7.3 Testes de acasalamento

Observou-se que todos os acasalamentos foram bem sucedidos. As estimativas de duração de cada gestação dentre os grupos testados foi de 22 dias para o primeiro cruzamento; 18 dias para o segundo cruzamento; o terceiro cruzamento originou duas ninhadas sendo que a primeira gestação foi de 23 dias, enquanto que a segunda foi aproximadamente de 27 dias; e o quarto cruzamento possuiu 23 dias de duração de gestação.

7.3.1 Análise fenotípica

Os resultados fenotípicos obtidos na geração F1 para os testes de acasalamento entre indivíduos da linhagem BALB/c com indivíduos da linhagem C57BL/6 do biotério A (Cruzamentos 1, 2 e 4) resultaram em 17 filhotes, que possuíam a coloração agouti, como esperado.

Para o Cruzamento 3, gerou-se um total de cinco filhotes, sendo três na primeira ninhada os quais apresentaram coloração preta e dois filhotes agouti, da segunda ninhada, oriundos do cruzamento pós-parto (Tabela 10, Figura 5).

Tabela 10: Análise fenotípica da coloração da pelagem da progênie F1 obtida a partir dos testes de acasalamento propositais realizados entre as linhagens de *Mus musculus* na Instituição A em Manaus – AM.

Cruzamentos	**Coloração da pelagem**	
	Esperada	**Observada**
1 - C57BL/6 (macho) X BALB/c (fêmea)	Agouti	Agouti (100%)
2 - C57BL/6 (macho) X BALB/c (fêmea)	Agouti	Agouti (100%)
3 - BALB/c (macho) X C57BL/6 (fêmea)	Agouti	Preta (60%) Agouti (40%)
4 - BALB/c (macho) X C57BL/6 (fêmea)	Agouti	Agouti (100%)

Figura 5: Filhotes irmãos de duas ninhadas de *Mus musculus* da Instituição A em Manaus-AM oriundos de cruzamento duplo do casal 3 (Cruzamento 3) apresentando diferença na coloração de pelagem.

7.3.2 Análise genotípica

Os dados referentes aos testes genotípicos dos indivíduos utilizados nos testes de acasalamento encontram-se apresentados nas tabelas a seguir:

Tabela 11: Genotipagem dos camundongos *Mus musculus* utilizados no Cruzamento 1 realizado no Biotério da Instituição A em Manaus-AM.

Locos	Genótipos dos indivíduos Cruzamento 1		
	Alelo ♂ (C57BL/6)	**Alelo ♀ (BALB/c)**	**Geração F1 (n = 9)**
D1Mit17	170 pb	176 pb	100% heterozigotos
D5Mit79	106 pb	136 pb	5 heterozigotos 4 homozigotos (106 pb)
D11Mit41	136 pb	178 pb	100% heterozigotos

n = número de indivíduos da progênie

Tabela 12: Genotipagem dos camundongos *Mus musculus* utilizados no Cruzamento 2 realizado no Biotério da Instituição A em Manaus-AM.

Locos	Genótipos dos indivíduos Cruzamento 2		
	Alelo ♂ (C57BL/6)	**Alelo ♀ (BALB/c)**	**Geração F1 (n = 4)**
D1Mit17	170 pb	176 pb	100% heterozigotos
D5Mit79	106 pb	136 pb	2 heterozigotos 2 homozigotos (106 pb)
D11Mit41	136 pb	136 pb*	100% homozigotos (136 pb)

*tamanho de alelo não esperado para este individuo, que deveria ser 178 pb; n = número de indivíduos da progênie

Tabela 13: Genotipagem dos camundongos *Mus musculus* utilizados no Cruzamento 3 realizado no Biotério da Instituição A em Manaus-AM.

Locos	Genótipos dos indivíduos Cruzamento 3		
	Alelo ♂ (BALB/c)	**Alelo ♀ (C57BL/6)**	**Geração F1 (n = 5)**
D1Mit17	176pb	170pb	2 heterozigotos 3 homozigotos (170 pb)
D5Mit79	136 pb	106 pb	1 heterozigoto 4 homozigotos (106 pb)
D11Mit41	178 pb	136 pb	2 heterozigotos 3 homozigotos (136 pb)

n = número de indivíduos da progênie

Pode-se perceber que os três indivíduos (primeira ninhada) que apresentaram uma coloração divergente dos outros indivíduos da geração F1, ou seja, a coloração preta em vez de agouti (Cruzamento 3), também apresentaram diferenças em relação a análise genotípica para os três locos analisados, apresentando somente uma banda correspondente ao alelo da genitora (Figura 6). Os indivíduos da segunda ninhada, assim como os dos outros cruzamentos (geração F1), em sua maioria, apresentaram perfil heterozigoto convenientes aos alelos do pai e da mãe para os microssatélites analisados, apesar da fêmea usada para o Cruzamento 2 apresentar tamanho de alelo diferente ao esperado para sua linhagem (Tabela 12).

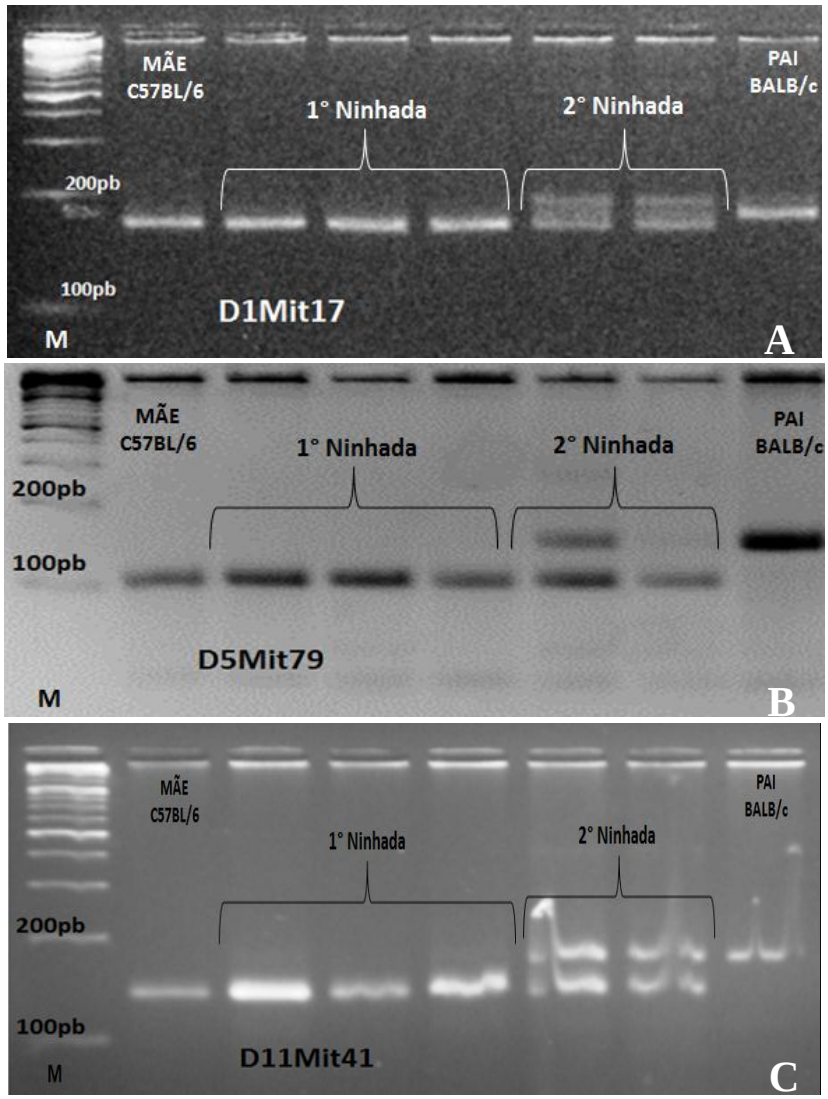

Figura 6: Genotipagem em gel de agarose 4% do produto de PCR dos animais utilizados no cruzamento 3 para três regiões microssatélites analisadas. A - loco D1Mit17; B - loco D5Mit79; C - D11Mit41; M – Marcador de peso molecular.

Tabela 14: Genotipagem dos camundongos *Mus musculus* utilizados no Cruzamento 4 realizado no Biotério da Instituição A em Manaus-AM.

Locos	**Genótipos dos indivíduos Cruzamento 4**		
	Alelo ♂ (BALB/c)	**Alelo ♀ (C57BL/6)**	**Geração F1 (n = 4)**
D1Mit17	176 pb	170 pb	100% heterozigotos
D5Mit79	136 pb	106 pb	1 heterozigoto 3 homozigotos (106 pb)
D11Mit41	178 pb	136 pb	100% heterozigotos

n = número de indivíduos da progênie

7.4 Análise de Polimorfismo e Diversidade Genética encontrada

Dos 10 locos microssatélites analisados, foram evidenciados cinco que apresentaram polimorfismo (indivíduos heterozigotos) para pelo menos uma linhagem: D1Mit17 para BALB/c do Instituto B; D5Mit79, D8Mit4 e D11Mit41 para BALB/c do Instituto A; e DXMit95 para as linhagens C57BL/6 e DBA/2 do Instituto A. Frente a presença de genótipos heterozigotos, foi realizado o cálculo da diversidade genética encontrada em cada linhagem para os locos analisados, utilizando-se a heterozigosidade média (Tabela 15), que é a medida mais comumente utilizada para caracterizar a diversidade genética (Frankham et al., 2008).

Para calcular a heterozigosidade (**H**) de cada loco microssatélite utilizou-se a fórmula:

$$H = \sum \left[\frac{n^{o}\ de\ indivíduos\ heterozigotos}{n^{o}\ total\ de\ indivíduos\ analisados} \right]$$

Tabela 15: Heterozigosidade média observada para os locos microssatélites em cada linhagem de *Mus musculus* das Instituições A e B em Manaus-AM.

Locos	Instituição A						Instituição B	
	BALB/c		C57Black		DBA2		BALB/c	
	Heterozigotos	Ho	Heterozigotos	Ho	Heterozigotos	Ho	Heterozigotos	Ho
D1Mit17	0	0	0	0	0	0	3	0,50
D3Mit49	0	0	0	0	0	0	0	0
D3Mit86	0	0	0	0	0	0	0	0
D5Mit79	3	0,50	0	0	0	0	0	0
D6Mit201	0	0	0	0	0	0	0	0
D8Mit4	5	0,83	0	0	0	0	0	0
D9Mit26	0	0	0	0	0	0	0	0
D10Mit233	0	0	0	0	0	0	0	0
D11Mit41	2	0,33	0	0	0	0	0	0
DXMit95	0	0	6	1	6	1	0	0
Ho média	0,166		0,1		0,1		0,05	

8. DISCUSSÃO

No presente estudo, o perfil genético molecular de três linhagens isogênicas de camundongos de dois Biotérios da cidade de Manaus - AM foi definido por 10 locos microssatélites.

Com base nos resultados, verificou-se a presença de resíduos de contaminação em todas as linhagens estudadas, revelando alterações no genoma quando comparadas com o padrão estabelecido no banco de dados *Mouse Genome Informatics*, em pelo menos um dos seguintes locos microssatélites: D1Mit17, D3Mit49, D3Mit86, D5Mit79, D8Mit4, D11Mit41 e DXMit95 (Figuras 1 a 4). Para a linhagem BALB/c do Biotério A foi detectado o maior grau de polimorfismo, tendo em vista que dos 10 locos analisados, três apresentaram indivíduos heterozigotos (D5Mit79, D8Mit4 e D11Mit41) e ainda, tamanhos alélicos maiores que o esperado para todos os animais (D3Mit49). Uma vez registrada a heterozigose, infere-se que esta linhagem pode estar contaminada e, provavelmente, decorre de evento recente. Consequentemente, estes alelos podem se fixar ao longo do tempo e propagar-se por toda a população. Por outro lado, o novo tamanho alélico observado no loco D3Mit49 pode indicar contaminação antiga. Tal resultado também foi encontrado por Passos (1997), revelando que é comum a seleção e fixação de alelos na população quando não há controle genético corrente.

As outras linhagens analisadas também apresentaram pelo menos um fato em desacordo com a uniformidade e perfil genético esperado, revelando indícios de contaminações: na Instituição A, a linhagem DBA/2 com indivíduos heterozigotos para o loco DXMit95 e divergência de tamanho de alelos para loco D3Mit86; a linhagem C57BL/6 com heterozigose para o loco DXMit95; e na Instituição B, a linhagem BALB/c com heterozigotos para loco D1Mit17.

Apesar dos camundongos possuírem o mais detalhado mapa genético entre os mamíferos (Blake et al., 2002; Gregory et al., 2002), a identificação do perfil genético de linhagens isogênicas, mesmo quando já caraterizadas é um trabalho muito complexo (Casellas, 2011). Para ter conhecimento por completo da verdadeira identidade do animal, seria necessário a análise de todo o conjunto genômico. Para isso seria necessário sequenciar o genoma de todos os animais da linhagem; uma tarefa possível, porém, trabalhosa e muito cara, fora do escopo deste projeto. Como o objetivo deste trabalho focou a realização de uma investigação genética, ou seja, a detecção de contaminações acidentais ou não, utilizou-se

marcadores microssatélites, sendo esta uma das técnicas mais informativas quando há suspeitas de contaminações genéticas (Tolwani et al., 2002).

Passos (1997) considera que a primeira etapa do procedimento padrão referente a linhagens isogênicas é adquirir as linhagens da colônia de fundação mais original possível (Staats, 1980). Após a experiência neste trabalho, cujos animais foram amostrados antes da 20ª geração e apresentaram polimorfismo não esperado, reiteramos a importância do rigor nos protocolos de acasalamento tanto até a obtenção da 20ª geração para geração estabelecimento da colônia de fundação como das gerações seguintes nas colônias de produção. Ainda, da essencialidade do estabelecimento de uma rotina de controle genético de maneira a evitar proliferação de contaminações, caso ocorram.

Até o conhecimento, esse é o primeiro estudo de investigação do perfil genético dos animais nos Biotérios da cidade de Manaus, desde a criação dos mesmos. Ainda que de forma incipiente, o acompanhamento genético das linhagens nestes Biotérios vem sendo realizado com base em marcadores morfológicos, que considera a observação dos animais durante os procedimentos de rotina (Passos, 1997; Rivas, 2008). Até o presente momento, em ambos os Biotérios não haviam sido registradas mudanças na cor de pelagem esperada, anormalidades externas, aumento da produtividade, diferenças reprodutivas, ou quaisquer outros sintomas que poderiam suspeitar de contaminações genéticas. Porém, tendo em vista o tempo de manutenção das linhagens (Tabela 1), e a baixa sensibilidade dos métodos morfológicos, há preocupações a respeito da real integridade genética das linhagens, visto que foram detectados polimorfismos não esperados em indivíduos de todas as linhagens. Ainda, porque estas linhagens vêm sendo utilizadas em pesquisas onde alterações fenotípicas, em nível de proteínas e metabolismo podem ser influenciadas pelas alterações genéticas que não são detectadas apenas com aspectos morfológicos. Portanto, é necessário que os Biotérios adotem métodos para testes gênicos, que possam incluir desde testes de acasalamentos a marcadores bioquímicos e moleculares, na tentativa de demonstrar que determinados genes não foram alterados (Passos, 1997).

Com base nos resultados obtidos neste trabalho e no sistema de acasalamento utilizado por ambos os Biotérios, as fontes de contaminação podem vir tanto de acasalamentos acidentais como de mutações, recombinações ou excessos de heterozigosidade residual, visto que os animais foram amostrados aleatoriamente das colônias de produção (e algumas

linhagens antes da 20° geração de endogamia). Ou seja, mesmo que os animais pertençam à mesma linhagem e por conceito tenham que ser geneticamente idênticos, muitos dos animais que foram utilizados não são filhos do mesmo casal, portanto, não são irmãos. Dessa forma, características contaminantes podem ser encontradas de forma desigual entre os animais da mesma linhagem.

A forma mais comum de contaminação genética em linhagens de camundongos isogênicas é a introdução de novos alelos por meio de acasalamentos acidentais entre indivíduos de linhagens diferentes (Nitzki et al., 2007). O uso de marcadores microssatélites possui a vantagem de identificar potenciais fontes de contaminações genéticas ocasionadas por essa forma, e até mesmo o cromossomo e a localização da contaminação (Tolwani et al., 2002). O tamanho dos alelos não esperados pode ser comparado ao tamanho esperado para outras linhagens isogênicas que potencialmente poderiam ser fontes de contaminação. Esse foi um dos métodos empregados por Nitzki, e colaboradores (2007), para detectar a fonte de contaminações genéticas em uma linhagem isogênica comercial de C57BL/6N, desvendando que os alelos provavelmente eram oriundos da linhagem DBA. Estes fatos demonstram a importância de se empregar, sempre que possível, marcadores moleculares para o compartilhamento de espaços em salas de criação com diferentes linhagens isogênicas.

No presente estudo, os valores do tamanho observado para os alelos esperados foram avaliados por meio de gel de agarose 4%, logo, trata-se de uma estimativa, onde valores próximos do esperado são considerados os mesmos. Levando em consideração essa estimativa, tamanhos de alelos diferentes do padrão para algumas linhagens aproximam-se de tamanhos de alelos para outras linhagens presentes no Biotério A, havendo também a possibilidade de contaminações provenientes de linhagens heterogênicas. Como exemplo, podem-se citar as diferenças do padrão estabelecido para as linhagens BALB/c e DBA. O D11Mit41 da linhagem BALB/c possuíram alelos (139 pb) que se assemelham ao tamanho dos alelos esperados para a linhagem C57Bl/6 (136 pb); enquanto que D5Mit79 possuíram alelos (147 pb) próximo aos esperados para a linhagem DBA/2 (144 pb). Em relação à linhagem DBA/2, a mesma apresentou alelos divergente do seu padrão em dois de seus locos (D3Mit86 – 168 pb e DXMit95 – 160 pb), mas com tamanhos esperados para as linhagens BALB/c (162 pb) e C57BL/6 (151 pb), respectivamente. Porém, há necessidade do conhecimento do tamanho exato dos alelos e, de preferência, o sequenciamento do loco, para poder afirmar essa fonte de contaminação; ou até mesmo o emprego de amostras de DNA

padrão, como controle positivo para as linhagens testadas. Apesar disso, mesmo na linhagem que apresentou maiores níveis de contaminação (BALB/c do Biotério A) a maioria dos locos analisados está de acordo com o padrão genético esperado, sugerindo que a ocorrência de acasalamentos acidentais, se verdadeiro, não é um fato recente. Enquanto que eventos de cruzamentos entre animais de linhagens diferentes que aconteceram há tempos atrás podem ainda estar resultando em seleção e fixação de alelos para estas linhagens. Essa forma de contaminação é praticamente uma indicação descartável para os animais da linhagem BALB/c do Biotério B, visto que esta é a única linhagem de camundongos que esteve presente no Biotério desde sua criação, impossibilitando, portanto, a mistura dessa linhagem com outra. Além disso, essa linhagem apresentou apenas um loco em discordância com o esperado (D1Mit17), sugerindo que este é um evento de deriva genética, e não uma contaminação. Entretanto, uma vez que a identificação de uma deriva genética é rara com esta metodologia, estudos aprofundados e com novos marcadores moleculares são fundamentais para a confirmação desta hipótese.

A segunda forma de contaminação que pode acontecer em linhagens isogênicas e explicar a heterozigosidade encontrada para os locos microssatélites é a ocorrência de mutações. Apesar de camundongos isogênicos serem mantidos rigidamente controlados por meio de acasalamentos consanguíneos, a ocorrência de mutações parece ser um evento frequente (Casellas, 2011), podendo levar a diferenciações significativas nas linhagens. Devido à ocorrência de mutações não ser um fenômeno controlável, o Comitê Internacional em Nomenclatura Genética decidiu que duas linhagens com a mesma origem, mas separadas em diferentes colônias por 100 ou mais gerações devem ser consideradas como duas sublinhagens diferentes e nomeadas diferentemente (Rivas, 2008; Guénet e Benavides, 2009). Eventos severos de mutações foram descritos por Shultz (1991), e um dos exemplos mais conhecidos é a mutação autossômica recessiva *nude* que reduziu a quantidade de linfócitos T na linhagem BALB/c. Outro exemplo foi relatado por Lin e colaboradores (1993), onde uma pequena mutação substituindo glicina por ácido aspártico no gene receptor de hormônio que libera o hormônio de crescimento surgiu em uma linhagem de C57BL/6J mantida no laboratório Jackson gerando o primeiro modelo animal anão.

As mutações podem acontecer devido a erros na replicação do DNA e não reparo disso pela polimerase, consequentemente, gerando novos alelos e incorporando-os no genoma e na população (Griffiths et al., 2008). Tal deslize é mais frequente em regiões repetitivas, como é

o caso de microssatélites. De acordo com Maia (2009), é 10.000 vezes mais provável um microssatélite ganhar ou perder um motivo de repetição de uma geração para a próxima, do que o gene para a hemoglobina sofrer uma mutação em única base, promovendo a desordem anemia falciforme. Logo, estima-se que mutações aconteçam em frequência de 10^{-7} a 10^{-6} por loco, por gameta, por geração (Schalager e Dickie, 1967). Quando a mutação acontece em algum lugar onde não influencia na expressão de proteínas, as linhagens praticamente não sofrem muita interferência a respeito de suas utilidades como modelos animais. Esse é um fato esperado para regiões microssatélites, que em sua grande maioria, não produzem nenhum tipo de proteína, pois costumam fazer parte de sequencias gênicas neutras, apesar de já ter sido relatada a interferência de microssatélites na regulação e expressão (Li et al., 2002). Por conseguinte, a mutação precisa de um tempo para se fixar, ou não, em todos os indivíduos da população. É possível que depois que os animais ultrapassam as gerações que os tornam completamente homozigotos, não são utilizados rígidos protocolos de cruzamento para propagar a linhagem nos Biotérios, o que poderia acarretar em acúmulo de polimorfismos gerados por mutações que constantemente ocorrem no interrompimento de endocruzamentos (Guénet e Benavides, 2009). A ocorrência de mutações é uma das possibilidades explicar a presença de heterozigosidade nos animais das linhagens estudadas, tendo em vista que a maioria das regiões microssatélites analisadas apresenta os locos em conformidade com o padrão para cada linhagem, indicando que naqueles poucos locos fora do padrão, provavelmente aconteceu alguma mutação pontual.

Apesar das características de animais isogênicos estarem relacionadas a isogenicidade dentro da população, homozigosidade, uniformidade fenotípica e estabilidade genética em longo prazo (Beck et al., 2000), o conceito de isogenia tolera e permite até 2% de heterozigosidade residual (Silver, 1995), devido a questões de sobrevivência da população (Ciencia al Dia Internacional, 2007). Existem regiões cromossomais onde se localizam genes que implicam em doenças muito desfavoráveis, quando em seu estado de homozigose (Ferguson et al., 2000; Rivas, 2008), tornando-se mais frequente, portanto, a presença de alelos heterozigotos nestas regiões. Casellas (2011) argumenta que a heterogeneidade genética em linhagens isogênicas pode, inclusive, ser mantida por várias gerações por seleção de heterozigotos, principalmente quando é utilizado mais que um casal por geração. Aqueles que tiverem maior heterozigosidade possivelmente possuem maior aptidão reprodutiva, propagando esta característica e levando vantagem em relação aos homozigotos, o que tem

sido postulado como uma forma de lutar contra a fixação de homozigose proveniente da endogamia (Bailey, 1982).

Porém, não se sabe exatamente quais são todas as regiões do genoma em que se permite determinada variabilidade. Segundo Bailey (1982), na 20ª geração do cruzamento endogâmico há um nível de variabilidade genética em mais de 200 locos polimórficos. Porém, com o contínuo e alto nível de endocruzamento das linhagens, a ocorrência de contaminações causadas por heterozigosidade residual é um paramêtro praticamente inexistente (Nitzki et al., 2007). Muitas instituições que comercializam animais isogênicos disponibilizam a alternativa de fornecer animais ainda em processo de isogenia, sendo que, quanto menor o numero de gerações para alcançar a isogenia os animais tiverem, menor o preço dos mesmos. Dessa forma, muitos Biotérios que necessitam de animais isogênicos para a realização de pesquisas biomédicas, costumam adquirir estes animais ainda antes da 20ª geração de acasalamento, comprometendo-se a dar continuidade aos cruzamentos consaguíneos em sua própria instituição, em vista de um menor custo. Portanto, o nível de heterozigosidade residual presente é um fator totalmente dependente da maneira e até qual geração os animais vem sendo reproduzidos consanguineamente.

Além das possibilidades citadas, pode ser que residualmente, as fitas de DNA do cromossomo sofram processos de recombinação, e dessa forma, mudem o tamanho dos alelos presentes (Griffiths et al., 2008). Há evidências sobre o importante papel das vias de recombinações homólogas para manter a estabilidade cromossomal e genética em murinos (Liang et al., 1998). Em 1998, também foi realizado um estudo por Frank e colaboradores, o qual mostrou que camundongos que apresentavam alelos mutantes homozigotos para o gene que codifica DNA ligase IV, não conseguiam produzir esta proteína, sugestiva na participação em processos finais de junção de DNA e recombinações. Anos depois, Ferguson e colaboradores (2000) publicaram sobre os mecanismos de recombinação de cromossomos não homólogos como uma via de reparo de quebras de DNA, apontando que a deficiência na produção de DNA ligase IV gera instabilidade genômica. Esses e outros estudos apontam a fragilidade de manutenção da estabilidade genética das linhagens isogênicas (Casellas e Medrano, 2008). Além disso, quebras e trocas de cromossomos na separação da meiose, junto com deriva genética aleatória e seleção podem ter um forte efeito de acumulação em sequencias repetitivas em tandem no genoma, devido à fragilidade existente nesse local (Charlesworth et al., 1994).

Estas contaminações podem, ocasionalmente, aumentar cada vez mais no genoma de cada indivíduo e, consequentemente, no perfil da população, caso as alterações genéticas indevidas sejam ignoradas. Pequenas mutações podem acumular até chegar em significante porcentagem de variância fenotípica (Casellas, 2011). Como os animais isogênicos precisam manter as características que assegurem a reprodutibilidade em pesquisas experimentais (Godfrey-Smith, 2003), o principal desafio dos profissionais é manter as linhagens geneticamente puras (Guénet e Benavides, 2009). De certa forma, a presença de contaminações nem sempre influencia no fenótipo do animal. Isso depende do tipo de contaminação, pois enquanto a presença de mutações influencia pouco no fenótipo, a ocorrência de acasalamentos acidentais é responsável pela maioria dos problemas (Nitzki et al., 2007), visto que sempre resulta em uma mudança repentina e massiva dos alelos (Guénet e Benavides, 2009). De qualquer forma, o problema principal é que as consequências são totalmente imprevisíveis e resquícios de contaminação podem aumentar a presença de certa variabilidade genética, tornando a linhagem cada vez menos pura e isso pode ter reflexo sobre conclusões experimentais.

Quanto aos testes de acasalamento, é sabido que estes se fundamentam na distribuição dos fenótipos observados e esperados entre cruzamentos de linhagens diferentes, pois, há uma padronização de colorações esperadas para muitos tipos de cruzamentos entre linhagens isogênicas. Os dados apresentados na Tabela 10 deste trabalho, resultantes da análise do fenótipo de coloração de pelagem de 22 animais da primeira geração (BALB/c X C57BL/6), apresentaram três indivíduos com coloração diferente os quais não possuíam a pigmentação agouti esperada e sim coloração preta. Vale ressaltar que a progênie com fenótipo diferente resultou do Cruzamento 3 onde, inesperadamente, a fêmea após ser colocada para acasalar, não apresentou as características típicas da pós-fecundação sendo, então, novamente colocada na presença do mesmo macho para novo acasalamento. Tal episódio resultou em duas ninhadas de fenótipos diferentes da mesma fêmea. Para explicar tal resultado, consideram-se duas possibilidades: a primeira é que essa divergência seja proveniente de um acasalamento prévio com um macho contaminado e que resultou no primeiro parto, enquanto que o segundo parto seja produto de um macho não contaminado; a segunda possibilidade é que a fêmea possivelmente já estava prenha (antes da separação da fêmea para o cruzamento induzido) de um macho da mesma linhagem (macho C57BL/6) quando foi separada e colocada pela primeira vez na presença do macho BALB/c. A segunda proposta é a mais provável uma vez

que pela análise genotípica do cruzamento, os filhotes da primeira ninhada tinham pelagem de coloração preta (indicando contaminação) e apresentaram somente os alelos provenientes da fêmea em todos os locos analisados (Figura 6) enquanto os da segunda ninhada apresentaram pelagem agouti e genótipo heterozigoto para todos os locos. As possibilidades para a ocorrência de cruzamentos inesperados na experimentação animal utilizando camundongos podem levar em consideração três principais fatores como os eventos de atraso no desmame, quando os filhotes machos são separados das fêmeas após estas já alcançarem sua capacidade reprodutiva, e neste caso, há possibilidade de acasalamento entre eles antes do isolamento; erros de sexagem, o que pode acontecer na montagem de uma gaiola de estoque, onde a presença de machos e fêmeas juntos pode permitir que a fêmea torne-se prenhe; e puberdade precoce, acarretada pelo início do desenvolvimento sexual antes do esperado para os camundongos, ou seja, antes do animal alcançar 42 dias de idade (Chorilli et al., 2007), possibilitando, dessa forma, a capacidade de prenhez.

Não é possível ter certeza sobre a ocorrência de algum desses eventos, visto que não se sabe detalhadamente os procedimentos anteriormente realizados até a chegada dos casais prontos para o cruzamento. Em adição a isso, as durações das gestações obtidas foram equivalentes para todas as ninhadas resultantes, tornando este dado não informativo para determinar se no cruzamento 3, as duas ninhadas são provenientes ou não de pais diferentes. No entanto, o evento da ocorrência de dois partos no experimento, resultando em ninhadas com análises fenotípicas e genotípicas diferentes entre elas, indicam a presença de acasalamento duplo desta fêmea, e que, não se tratava do mesmo macho.

Na análise do loco microssatélite D5Mit79 para o teste de acasalamento, pode-se observar que a maioria dos indivíduos da progênie, levando em consideração todos os cruzamentos, não apresentou o genótipo heterozigoto, como se esperava. Isso, possivelmente pode ser explicado devido à ocorrência de alelos nulos ou de alelos *drop-out*. Os alelos nulos são resultantes de mutações nas sequencias de flanqueamento dos *primers*, evitando o anelamento destes, e assim, a amplificação da região microssatélite. Tal possibilidade já foi demonstrada por Fernández e colaboradores (2008), por meio de sequenciamento dos locos microssatélites. Além disso, também há a probabilidade de ser interferência de elementos de transposição, que são sequencias gênicas que podem se inserir e mudar a região de anelamento de *primers* para amplificação do loco microssatélite (Ding et al., 2005). Os alelos *drop-out*, por sua vez, são caracterizados pela amplificação preferencial de um alelo (Garvin,

et al., 1998). O baixo rendimento da quantidade de DNA em testes de amplificação, referente ao pequeno número de cópias, resulta na obtenção aparente de genótipos homozigotos, embora seja possível a visualização fraca do outro alelo esperado, que determinaria um genótipo heterozigoto. Tal fato também foi observado na análise do loco D5Mit79, sendo esta uma das possibilidades responsáveis pelo desaparecimento de alelos esperados nesse loco.

Apesar de tudo, nenhum tipo de Biotério está imune à ocorrência de contaminações. Sempre é necessário considerar que contaminações genéticas podem surgir a qualquer momento, sejam de formas naturais, como mutações; ou até mesmo contaminações acidentais, por descuido e falta de protocolo rigoroso de acasalamento. Frente a estes eventos de contaminação, torna-se praticamente impossível a manutenção de uma isogenia absoluta por inúmeras gerações (Casellas, 2011).

Felizmente, as características de não isogenia das linhagens, dependendo do grau de comprometimento, podem ser contornadas por meio de adequação dos procedimentos de cruzamentos, determinação dos casais reprodutores e o tamanho da população de acordo com o resultado do monitoramento molecular no fluxo da propagação. Neste caso, a recomposição da linhagem deverá acontecer com o auxílio de técnicas de monitoramento genético; avaliação de mapas genéticos e planilhas de reprodução que permitam a seleção de casais que mantém as características originais da linhagem. O principal objetivo é conseguir eliminar reprodutores que apresentem regiões gênicas que desviam do padrão genético da população, por meio de cruzamentos. De acordo com Nitzki e colaboradores (2007), em vários Biotérios onde se utilizam animais para pesquisas biomédicas, as colônias de fundação são periodicamente substituídas pelos mesmos animais, na tentativa de reduzir derivas genéticas entre laboratórios diferentes.

Portanto, seria pertinente selecionar para cruzamento apenas animais que passem por uma investigação com microssatélites e apresentem o perfil genético esperado para todos os locos analisados, devendo os resultados serem transferidos para mapas genéticos que registrem o comportamento das linhagens frente a heranças poligênicas como o número médio de crias, por exemplo. Tal procedimento conferiria maior nível de confiança genética possível para que estes animais fossem geradores das colônias adiante, e assim diminuiria riscos de reproduzir alelos em desacordo com a linhagem, não os mantendo em segregação (Guénet e Benavides, 2009), gerando modelos animais mais confiáveis. Em continuidade,

deveria em cada geração, se proceder a realização de testes de controle genético com os novos animais gerados. A análise de microssatélites em linhagens isogênicas pode fornecer conhecimento sobre o perfil genético da população e dessa forma, ajudar na forma de manejo e monitoramento das linhagens, permitindo manter um programa sensível e eficiente para assegurar a qualidade genética (Tolwani et al., 2002). Dessa forma, a pesquisa investigando o perfil genético das linhagens de camundongos poderia prosseguir no desenvolvimento de um plano de gestão direcionado a unificação das linhagens conforme o padrão estabelecido, levando em consideração o nível máximo de endogamia permitida e fixação dos alelos constituintes.

Tendo em vista a obtenção de resultados que apresentam desvios dos padrões esperados, Guénet e Benavides (2009) recomendam o uso de um maior número de microssatélites, alguns flanqueando os alelos mutantes. Isso ofereceria um maior número de informações em relação ao grau de contaminação das linhagens analisadas.

Segundo De Jesús e colaboradores (2011), também não se pode descartar a possibilidade de as colônias formarem sublinhagens, tendo em vista que a divergência genética das linhagens consanguíneas é um fenômeno inevitável. Tolwani e colaboradores (2002) detectaram o surgimento de sublinhagens em individuos da mesma linhagem isogênica utilizando sondas minissatélites (RFLP), até então não detectadas com regiões microssatélites. Porém, sublinhagens também podem ser diferenciadas por meio do uso de marcadores microssatélites (Slingsby et al., 1996). Para tanto, é necessária a realização de um escaneamento mais amplo (*genome wide scan*) com marcadores microssatélites dispostos em distâncias próximas possibilitando uma “varredura” completa do genoma (Slingsby et al., 1996; Tolwani et al., 2002). Outra estratégia é o emprego de marcadores SNP na definição da linhagem (Petkov et al., 2004). Contudo, é fundamental destacar que somente por meio de programas de monitoramento genético periódico das colônias é que se torna possível o reconhecimento e caracterização de sublinhagens.

A possibilidade de contaminações genéticas foi agora molecularmente documentada para os Biotérios analisados. Porém, tendo em vista que este é o primeiro trabalho a ser realizado com esse foco e, ainda, que há possibilidade de artefatos da técnica de amplificação influenciarem os resultados, há necessidade do sequenciamento dos alelos encontrados nos animais para confirmação dos polimorfismos. Apesar das possibilidades naturais de

instabilidade genética em linhagens isogênicas, é necessário a utilização de mais marcadores microssatélites, ou complemento de técnicas para maior ciência do nível de isogenia das linhagens analisadas e a fim de padronizar um protocolo rigoroso de controle genético nestes Biotérios.

Na literatura encontram-se relatos de que contaminações genéticas não são problemas exclusivos. Passos realizou no final dos anos 90, um estudo comparativo entre matrizes de linhagens isogênicas de Biotérios nacionais e internacionais, encontrando contaminações em duas linhagens de Biotérios nacionais (CBA e BALB/c) (Passos, 1997). Até mesmo linhagens de origem comercial não estão imunes a presença de contaminações (Kaham et al., 1982; Nitzki et al., 2007). As pesquisas realizadas e as condições naturais sugerem que linhagens isogênicas acabam sendo frágeis do ponto de vista genético. De qualquer forma, mesmo que estas linhagens não sejam completamente isogênicas, elas proveem um modelo de homogeneidade animal de moderada a baixa variabilidade genética, sendo modelos muito úteis e vantajosos quando comparado às linhagens heterogênicas (Casellas, 2011).

Idealmente, o controle genético das diversas linhagens isogênicas mantidas nos Biotérios deveria ser realizado dentro de uma rotina de trabalho. Porém, não é uma prática usual entre os Biotérios brasileiros, e nem sempre possível devido aos custos operacionais e falta de pessoal qualificado. Tendo em vista a ausência de programas de monitoramentos para linhagens isogênicas em muitos Biotérios nacionais, onde os animais são frequentemente utilizados em testes farmacológicos, toxicológicos e pesquisas nas áreas de saúde, a disponibilização de marcadores moleculares que sejam eficientes na distinção molecular entre os animais das principais linhagens, facilitaria a implantação rotineira destas técnicas nos Biotérios que possuem linhagens isogênicas.

9. CONCLUSÃO

A avaliação de marcadores microssatélites permitiu constatar a condição de homozigose e/ou heterozigose dos indivíduos e de alelos novos nas linhagens isogênicas de camundongos BALB/c, C57BL/6 e DBA/2 presentes nos dois Biotérios da cidade de Manaus. Todas as linhagens analisadas apresentaram polimorfismo, em seus indivíduos, em pelo menos um dos locos analisados.

10. CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Com base nos resultados deste trabalho, reforça-se:

1. A necessidade de estabelecimento de programas de controle genético em Biotérios brasileiros;
2. A necessidade de implantação de programas de capacitação técnica para reduzir as chances de contaminação por falha humana;
3. Um aprofundamento na Investigação de matrizes das colônias de fundação destas linhagens;
4. A criação de um Banco de DNA padrão que possibilite o estabelecimento de programas de monitoramento genético em biotérios da região.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aitman, T.J.; Critser J.; Cuppen, E.; Dominiczak, A.; Fernandez-Suarez, X.M.; Flint, J. Gauguier, D.; Geurts, A.M.; Gould, M.; Harris, P.C.; Holmdahl, R.; Hubner, N.; Izsvák, Z.; Jacob, H.J.; Kuramoto, T; Kwitek, A.E.; Marrone, A.; Mashimo, T.; Moreno, C.; Mullins, J.; Mullins, L.; Olsson, T.; Pravenec, M.; Riley, L.; Saar, K.; Serikawa, T.; Shull, J.D.; Szpirer, C.; Twigger, S.N; Voigt, B.; Worley, K. 2008. Progress and prospects in rat genetics: a community view. *Nature Genetics*, 40: 516–522.

Allen, W.; Cowley, J. 2003. Genomics and Homeostasis. *American Journal of Physiology*, 284: 611–627.

Bailey, D.W. 1982. How pure are inbred strains of mice? *Immunology*, 3: 210-214.

Beck, J.A.; Lloyd, S.; Hafezparast, M.; Lennon-Pierce, M.; Eppig, J.T.; Festing, M.F.W.; Fischer, E.M.C. 2000. Genealogies of mouse inbred strains. *Nature Genetics*, 24: 23-25.

Benavides, F.; Glasscock, E.; Coghlan, L.G.; Stern, M.C.; Weiss, D.A.; Conti, C.J. 2001. PCR-based microsatellite analysis for differentiation and genetic monitoring of nine inbred SENCAR mouse strains. *Laboratory Animals*, 35: 157-162.

Benavides, F.; Stern, M.C.; Glasscock, E.; DiGiovanni, J.; Coghlan, L.G.; Conti, C.J. 2000. Microsatellite DNA Variants Between the Inbred SENCAR Mouse Strains. *Molecular Carcinogenesis*, 28: 191-195.

Bender, K.; Adams, M.; Baverstock, P.R.; Den Bieman, M.; Bissbort, S.; Brdicka, R.; Butcher, G.W.; Cramer, D.V.; Von Deimling, O.; Festing, M.F.W.; Gtinther, E.; Guttmann, R.D.; Hedrich, H.J.; Kendall, P.B.; Kluge, R.; Moutier, R.; Simon, B.; Womack, J.E.; Yamada, J.; Van Zutphen, B. 1984. Biochemical markers in inbred strains of the rat (*Rattusnorvegicus*). *Immunogenetics*, 19**:** 257–266.

Benton, C.S.; Miller, B.H.; Skwerer, S.; Suzuki, O.; Schultz, L.E.; Cameron, M.D.; Marron, J.S.; Pletcher, M.T.; Wiltshire, T. 2011. Evaluating genetic markers and neurobiochemical analyses for fluoxetine response using a panel of mouse inbred strains. *Psychopharmacology*, 221: 297-315.

Blake, J.A.; Richardson, J.E.; Bult, C.J.; Kadin, J.A.; Eppig, J.T. Group MGD. 2002. The mouse genome database (MGD): the model organism database for the laboratory mouse. *Nucleic Acids Research*, 30(1): 113-115.

Blake, J.A.; Bult, C.J.; Kadin, J.A.; Richardson, J.E.; Eppig, J.T.; Group MGD. 2011. The mouse Genome Database (MGD): premier model organism resource for mammalian genomics and genetics. *Nucleic Acids Research*, 39: 842-848.

Bressan, F.F. 2008. *Produção de animais transgênicos por transferência nuclear como modelo de estudo biológico.* Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/Universidade de São Paulo, Pirassununga, São Paulo. 86pp.

Bryda, E.C.; Riley, L.K. 2008. Multiplex Microsatellite Marker Panels for Genetic Monitoring of Commom Rat Strains. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 47: 37-41.

Caballero, A.; Keightley, P.D.; Hill, W.G. 1991. Strategies for increasing fixation probabilities of recessive mutations. *Genetics Research*, 58: 129-138.

Casellas, J. 2011. Inbred mouse strains and genetic stability: a review. *Animal*, 5(1): 1-7.

Casellas, J.; Medrano, J.F. 2008. Within generation mutation variance for litter size in inbred mice. *Genetics*, 179: 2147-2155.

Charlesworth, B.; Sniegowski, P.; Stephan, W. 1994. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature*, 371: 215-220.

CGEE, 2003. Programa de Ação para Biotérios, (www.redetec.org.br/publique/media/bioterios.pdf). Acesso: 31/10/2013.

Chorilli, M.; Michelin, D.C.; Salgado, H.R.N. 2007. Animais de laboratório: o camundongo. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 28: 11-23.

Ciencia al Dia Internacional. 2007. Disponível em (C:\Documents and Settings\USURARIO\Mis documentos\tesis\CienciaalDía Internacional – Golsario.htm). Acesso: 9/10/2013.

De Jesús, R.; Rodríguez, N.; Torres, W.; Moreno, Y.; O'Callaghan, J. 2011. Uso de marcadores moleculares microssatélites para determinar condición de homocigosis y heterocigosis em roedores producidos em El Bioterio de La Universidad de Los Andes, Venezuela. *Avances enInvestigación Agropecuária*, 15 (2): 45-63.

DeLorenzo, R.J.; Ruddle, F.H. 1969. Genetic Control of two electrophoretic variants of glucosephosphateisomerase in the mouse (*Mus musculus*). *Biochemical Genetics*, 3: 151-162.

Demers, G.; Griffin, G.; Vroey, G.D.; Haywood, J.R.; Zurlo, J.; Bedard, M. 2006. Harmonization of Animal Care and Use Guidance. *Science*, 312: 700-701.

Ding, S.; Wu, X.; Li, G.; Han, M.; Zhuang, Y.; Xu, T. 2005. Efficient Transposition of the piggyback Resource (PB) Transposon in Mammalian Cells and Mice. *Cell*, 122: 473-483.

Feijó, A.M.G.S.; Braga, L.M.G.M.; Pitrez, P.C. 2010. *Animais na pesquisa e no ensino: aspectos éticos e técnicos.* EDIPUCRS. Porto Alegre, RS, BR. 421 pp.

Ferguson, D.O.; Sekiguchi, J.M.; Chang, S.; Frank, K.M.; Gao, Y.;DePinho, R.A.; Alt, F.W. 2000. The nonhomolougous end-joining pathway of DNA repair is required for genomic stability and the suppression of translocations. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97 (12): 6630 – 6633.

Fernández, M.P.; Nuñez, E.Y.; Ponz, F.; Gernáiz, S.; Gallego, F.J.; Ibáñez, J. 2008. Characterization of sequence polymorphisms from microsatellite flanking regions in *Vitis* spp. *Molecular Breeding*, 22:455-465.

Ferreira, L.M.; Hochman, B.; Barbosa, M.V.J. 2005. Modelos experimentais em pesquisa. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 20: 28-34.

Festing, M.F.W. 1975. A case for using inbred strains of laboratory animals in evaluating the safety of drugs. *Food and Cosmetics Toxicology*, 13: 369-375.

Festing, M.F.W. 1979. *Inbred strains in biomedical research*. Oxford University Press, New York, USA. 483pp.

FINEP, 2007. Financiadora de Estudos e Projetos (www.finep.gov.br/fundos_setoriais/acao_transversal/editais/TIB_Bioterios_05_2007.pdf). Acesso: 30/10/2013.

Frank, K.M.; Sekiguchi, J.M.; Seidl, K.J.; Swat, W.; Rathbun, G.A.; Cheng, H.L.; Davidson, L.; Kangaloo, L.; Alt, F.W. 1998. Late embryonic lethality and impaired V(D)J recombination in mice lacking DNA ligase IV. *Nature*, 396, 173-177.

Frankham, R.; Ballou, J.D.; Briscoe, D.A. 2008. *Fundamentos de Genética da Conservação.* Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. 280pp.

Galli-Taliadoros, L.A.; Sedgwick, J.D.; Wood, S.A.; Korner, H. 1995. Gene knock-out technology: a methodological overview for the interested novice. *Journal of Immunological Methods*, 181: 1-15.

Garvin, A.M.; Holzgreve, W.; Hahn, S. 1998. Highly accurate analysis of heterozygous loci by single cell PCR. *Nucleic Acids Research*, 26 (15): 3468-3472.

Godard, A.L.B.; Guénet, J. 1999. Modelos Animais de Doenças Humanas. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, 9: 96-100.

Godfrey-Smith, P. 2003. *Theory and reality: an introduction to the philosophy of science*. University of Chicago Press, Chicago, IL, USA.

Gregory, S.G.; Sekhon, M.; Schein, J.; Zhaos, S.; Osoegawak, K.; Scott, C.E.; Evans, R.S.; Burridge, P.W.; Cox, T.V.; Fox, C.A.; Hutton, R.D.; Mullenger, I.R.; Phillips, K.J.; Smith, J.; Stalker, J.; Threadgold, G.J.; Birney, E.; Wylie, K.; Chinwalla, A.; Wallis, J.; Hillier, L.; Carter, J.; Gaige, T.; Jaeger, S.; Kremitzki, C.; Layman, D.; Maas, J.; McGrane R.; Mead, K.; Walker, R.; Jones, S.; Smith, M.; Asano, J.; Bosdet, I.; Chan, S.; Chittaranjan, S.; Chiu, R.; Fjell, C.; Fuhrmann, D.; Girn, N.; Gray, C.; Guin, R.; Hsiao, L.; Krzywinski, M.; Kutsche, R.; Lee, S.S.; Mathewson, C.; McLeavy, C.; Messervier, S.; Ness, S.; Pandoh, P.; Prabhu, A.T.; Saeedi, P.; Smailus, D.; Spence, L.; Stott, J.; Taylor, S.; Terpstra, W.; Tsai, M.; Vardy, J.; Wye, N.; Yang, G.; Shatsman, S.; Ayodeji, B.; Geer, K.; Tsegaye, G.; Shvartsbeyn, A.; Gebregeorgis, E.; Krol, M.; Russell, D.; Overton, L.; Malek, J.A.; Holmes, M.; Heaney, M.; Shetty, J.; Feldblyum, T.; Nierman, W.C.; Catanesek, J.J.; Hubbard, T.; Waterston, R.H.; Rogers, J.; Jongk, P.J.; Fraser, C.M.; Marra, M.; McPherson, J.D.; Bentley, D.R. 2002. A physicalmapofthe mouse genome. *Nature*, 418(15): 743-750.

Griffiths, A.J.F.; Wessler, S.R,; Lewontin, R.C.; Carrol, S.B. 2008. *Introdução à Genética.* Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil. 712pp.

Guénet, J.; Benavides, F.J. 2009. Genetic Monitoring of Laboratory Rodents. *Molecular Diagnostics*, 31: 461-269.

Haldane, J.B.S. 1993. The genetics of cancer. *Nature*, 132: 265-267.

Head, J.R.; Billingham, R.E. 1985. Immunologically privileged sites in transplantation immunology and oncology. *Perspectives in Biology and Medicine*, 29: 115-131.

Henderson, N.S. 1966. Isozymes and genetic control of NADP-malate dehydrogenase in mice. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 28: 117

Kahan, B.; Averbach, R.; Alter, B.J; Bach, F.H. 1982.Histocompatibility and isoenzyme differences in commercially supplied "BALB/c" mice. *Science*, 217: 379-381.

Li, Y-C.; Korol, A.B.; Fahima, T.; Beiles, A.; Nevo, E. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, 11: 2453-2465.

Liang, F.; Han, M.; Romanienko, P.J.; Jasin, M. 1998. Homology-directed repair is a major double-strand break repair pathway in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 95: 5172-5177.

Lin, S.C.; Lin, C.R.; Gukovsky, I.; Lusis, A.J.; Sawchenko, P.E.; Rosenfeld, M.G. 1993. Molecular basis of the little mouse phenotype and implications for cell type-specific growth. *Nature*, 364: 208-213.

LCSA, 2010. Laboratório de Controle Sanitário Animal. (www3.icb.usp.br/corpoeditorial/ARQUIVOS/bioterio/RELATORIO_ANUAL_DE_BACTERIOLOGIA.pdf). Acesso: 30/10/2013.

Maia, S.H.Z. 2009. *Diversidade Genética na videira Itália (*Vitis vinífera *L.) utilizando marcadores microssatélites.* Tese de doutorado, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil. 58 pp.

Mashimo, T; Voigt, B; Tsurumi, T; Naoi, K; Nakanishi, S; Yamasaki, K; Kuramoto, T; Serikawa, T. 2006. A set of highly informative rat simple sequence length polymorphism (SSLP) markers and genetically defined rat strains. *BMC Genetics*, 7: 19.

Massironi, S.M.G. 2009. Padrão Genético, p. 385-398. In: Lapchik, V.V.; Mattaraia, V.M.; Miko, G. (Eds.). *Cuidados e manejos de animais de laboratório.* V.2. São Paulo: Atheneu Editora. p. 385-398.

Massironi, S.M.G.; Reis, B.L.F.S.; Carneiro, J.G.; Barbosa, L.B.S.; Ariza, C.B.; Santos, G.C.; Guénet, J.; Godard, A.L.B. 2006. Assessing gene function by inducing mutations in the mouse genome. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research,* 39: 1217-1226.

Mekada, K.; Abe, K.; Murakami, A.; Nakamura, S.; Nakata, H.; Moriwaki, K.; Obata, Y.; Yoshiki, A. 2009. Genetic differences among C57BL/6 Substrains. *Journal of Experimental Animal Science,* 58: 141-149.

MGI, 2012.Inbred strains of mice. (*http://www.informatics.jax.org/external/festing/mouse/docs/BALB.shtml).* Acesso: 7/11/2013.

Nitzki, F.; Kruger, A.; Reifenberg, K.; Wojnowski, L.; Hahn, H. 2007. Identification of a genetic contamination in a commercial mouse strain using two panels of polymorphic markers. *Laboratory Animals,* 41: 218-228.

Passos, L.A.C. 1997. *O uso da reação de polimerase em cadeia na monitoração genética de linhagens isogênicas de camundongos utilizadas em imunologia.* Dissertação de mestrado, Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo. 84 pp.

Petersen, G.; Johnson, P.; Andersson, L.; Klinga-Levan, K.; Gomes-Fabre, P.M.; Stahl, F. 2005. RatMap – Rat Genome Tool and Data. *Nucleics Acid Research,* 33: 292-294.

Petkov, P.M.; Cassel, M.A.; Sargent, E.E.; Donnelly, C.J.; Robinson, P.; Crew, V.; Asquith, S.; Vonder Haar, R.; Wiles, M.V. 2004. Development of a SNP genotyping panel for genetic monitoring of the laboratory mouse. *Genomics,* 83: 902-911.

Politi, F.A.S.; Pietro, R.C.L.R.; Salgado, H.R.N. 2008. Caracterização de biotérios, legislação e padrões de biossegurança. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada,* 29: 17-28.

Rivas, Y.J.M. 2008. *Estudio de la condición genética y fisiológica de la cepa C57Bl/6//BIOU producida em El bioterio de La Universidad de Los Andes.* Trabalho de Conclusão de Curso, Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela. 96pp.

Roder, M.S.; Plaschke, J.; Konig, S.U.; Borner, A.; Sorrells, M.E.; Tanksley, S.D.; Ganal, M.W. 1995. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Molecular Genetics*, 246: 327-333.

Rogero, M.M.; Borges, M.C.; Pires, I.S.O.; Tirapegui, J. 2010. O desmame precoce afeta o ganho de peso e a composição corporal em camundongos adultos? *Revista de Nutrição*, 23: 85 – 93.

Rosenkranz, A.; Jurkiewicz, A.; Corrado, A. 1978. Situação dos biotérios brasileiros: fator limitante de estudos farmacodinâmicos e toxicológicos de produtos naturais. *Ciência e Cultura*, 32: 156-163.

Santos, B.F. 2002. Criação e manejo de camundongos. p: 115-118. *In*: Andrade, A.; Pinto, S.C.; Oliveira, R.S. Animais de Laboratório: criação e experimentação. V.1. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, BR.

Shang, H.; Wei, H.; Yue, B.; Xu, P.; Huang, H. 2009. Microsatellite analysis in two populations of Kunming mice. *Laboratory animals*, 43: 34.

Shultz, L.D. 1991. Immunological mutants of the mouse. *The American journal of anatomy*, 191: 303-311.

Silva, A.S. 2006. *Avaliação do padrão de resposta de imunoglobulinas em diferentes linhagens de camundongos frente à infecção por T. cruzi*. Dissertação de Mestrado. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo. 48 pp.

Silva Neto, L.; Aghae, A.; Guénet, J.; Godard, A.L.B. 2005. The paralysé (par) mouse neurological mutation maps to a 9 Mb (4 cM) interval of mouse chromosome 18. *Genetics and Molecular Biology*, 28: 201-204.

Silver, L.M. 1995. *Mouse genetics.Concepts and Applications.* New York: Oxford University Press, England, UK. 357 pp.

Slingsby, J.H.; Hogarth, M.B.; Simpson, E; Walport, M.J.; Morley, B.J. 1996. New microsatellite polymorphisms identified between C57BL/6, C57BL/10, and C57BL/KsJ inbred mouse strains. *Immunogenetics*, 43: 72-75.

Souza, F.I. 2007. *Estudo da ação das neuregulinas 1-alfa e 1-beta na regeneração nervosa. Estudo experimental em camundongos isogênicos (C57BL/6J).* Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo. 99 pp.

Sperling, S.R. 2011. Systems biology approaches to heart development and congenital heart disease. *Cardiovascular Research*, 91: 269-278.

Staats, J. 1980. Standardized nomenclature for inbred strains of mice seventh list. *Cancer Research*, 409: 2083-2128.

Stallings, R.L.; Ford, A.F.; Nelson, D.; Torney, D.C.; Hildebrand, C.E.; Moysis, R.K. 1991. Evolution and distribution of (GT)n repetitive sequences in mammalian genomes. *Genomics*, 10: 807-815.

Strong, L.C. 1942. The origin of some inbred mice. *Cancer Research*, 2: 531-539.

Tanaka, M.H.A.; Vintersten, K.; Nagy, A. 2010. Aggregation chimeras: combining ES cells, diploid, and tetraploid embryos. *Gene knockout protocols, Humana Press:* 287 -311.

Tolwani, R.J.; Varma, S.; Otto, G. 2002. Use of molecular methods for genetic monitoring of an Institutional Mouse Breeding Colony. *American Association for Laboratory Animals*, 41(4): 23-29.

Weigert, M.; Riblet, R. 1978. The genetic control of antibody variable regions in the mouse. *Springer Seminars in Immunopathology*, 1: 133-169.

Williams, D.E.; Evans, D.M.D.; Blamey, R.W. 1971. The primary implantation of human tumours to the hamster cheek pouch. *British Journal of Cancer*, 5: 533-537.

Wolff, R.; Gemmill, R. 1997.p: 1-81. Purifying and analysing genomic DNA. *In*: Birren, B.; Grenn, E.; Klapholz, S.; Myers, R.; Roskams, J. (eds). Genome analysis. A laboratory manual.Volume 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.

Yoshiki, A.; Moriwaki, K. 2006. Mouse Phenome Research: Implications of Genetic Background. *ILAR Journal*, 47: 94-102.