



Banco de Embriões de Camundongos Geneticamente Modificados

Uma estratégia para a preservação da diversidade genética em modelos experimentais murinos

Milena Botelho Pereira Soares

Dra., Pesquisadora, Centro de Pesquisas
Gonçalo Moniz - FIOCRUZ
msoares@e-net.com.br

Laín Carlos Pontes de Carvalho

Dr., Pesquisador Titular, Centro de Pesquisas
Gonçalo Moniz - FIOCRUZ
lain@svm.com.br

Ricardo Ribeiro dos Santos

Prof., Dr., Pesquisador Titular e Coordenador
do Biotério
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz -
FIOCRUZ
rrsantos@e-net.com.br
Fotos cedidas pelos autores

Desde o final do século passado estamos testemunhando uma verdadeira explosão na geração de produtos por meio de metodologias de manipulação genética de organismos vivos. A preservação desse patrimônio genético criado pelo ser humano, assim como da diversidade genética natural, tem sido alvo de grande preocupação e debate. Graças ao desenvolvimento de técnicas de criopreservação, hoje é possível a manutenção, a baixas temperaturas, e por tempo indeterminado, de células, de embriões e até de tecidos animais. Bancos de germoplasma têm sido criados para assegurar a preservação do material genético de organismos diversos, tais como animais domésticos, animais em risco de extinção, plantas e microorganismos. A grande biodiversidade encontrada em nosso país já estimulou a implantação de vários bancos genéticos no Brasil, com o objetivo de assegurar a preservação das espécies.

O mundo da investigação científica também sofre um problema similar. Animais de experimentação, especialmente camundongos (*Mus musculus domesticus*), são criados em biotérios que possuem espaço limita-

do. O número de linhagens de camundongos disponíveis vem aumentando de forma exponencial, sobretudo no que se refere a linhagens geneticamente modificadas. Estima-se que estejam disponíveis no mer-

cado mundial mais de 2.000 linhagens de camundongos geneticamente modificados. Analisaremos, a seguir, a importância da implantação de bancos de embriões de camundongos no Brasil.

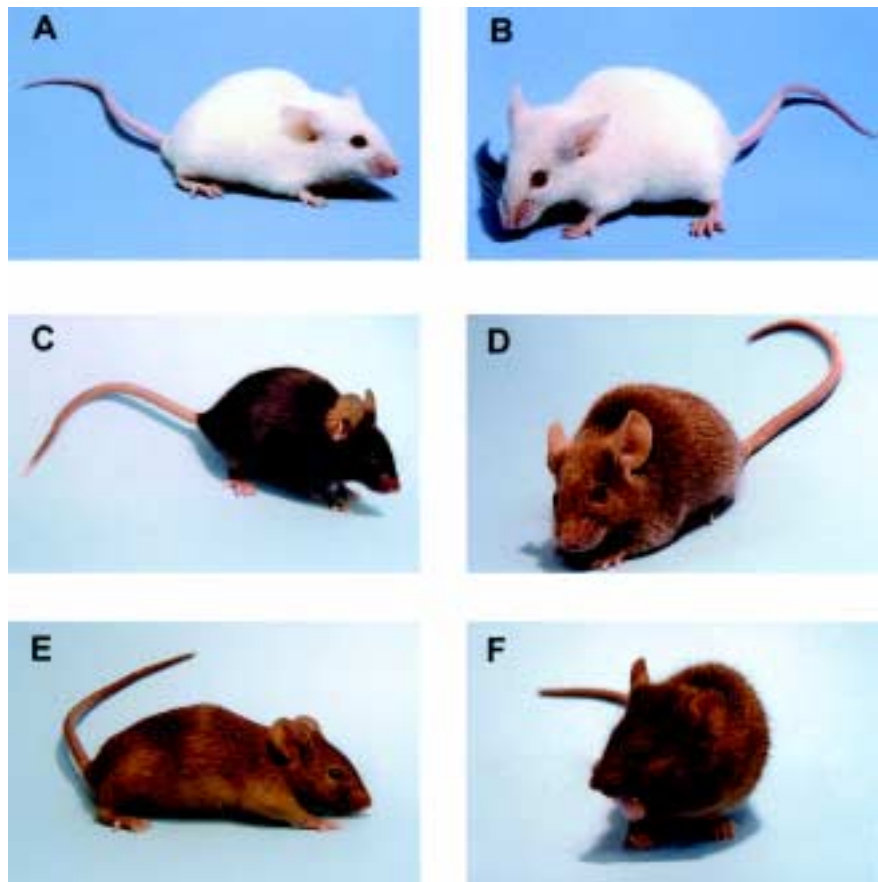


Figura 1. Linhagens isogênicas de camundongos. **A:** A (Albino, H-2^a); **B:** BALB/c (Albino, H-2^d); **C:** C57Bl6 (Black, H-2^b); **D:** DBA-2 (Dilute brown, H-2^d); **E:** CBA (Agouti, H-2^k); **F:** C3H (Agouti, H-2^k). Estas linhagens apresentam susceptibilidades distintas a diferentes doenças, e permitem a investigação de mecanismos patogênicos pela comparação interlinhagens

IMPORTÂNCIA DO CAMUNDONGO COMO MODELO EXPERIMENTAL

Linhagens de camundongos têm sido utilizadas como modelos experimentais de pesquisa biomédica desde o início do século 20. O camundongo é o animal experimental de escolha em várias áreas por ser de fácil criação e manipulação, ter uma reprodução rápida e apresentar uma grande diversidade genética. Foram criadas linhagens isogênicas, pelo cruzamento entre irmãos, durante, pelo menos, 20 gerações, o que deu origem a populações de camundongos geneticamente idênticos. Atualmente, existem mais de 400 linhagens isogênicas de camundongos disponíveis, cada uma contendo características genéticas distintas (Figura 1). A utilização de linhagens de camundongos geneticamente padronizados contribuiu enormemente para os avanços nas áreas de genética, câncer, transplantes e imunologia. A preservação das características genéticas dessas linhagens é também um importante problema de criação de animais em biotério, já que o aparecimento espontâneo de mutações modifica as características das mesmas, quando mantidas como colônias abertas durante um longo período.

Investigações feitas a partir dos anos 50 demonstraram que camundongos isogênicos servem como doadores de enxertos para animais da mesma linhagem por apresentarem histocompatibilidade antigênica (Figura 2). Transplantes de órgãos de camundongos para linhagens diferentes são sistematicamente rejeitados. Camundongos imunodeficientes, como a linhagem nude (nu/nu) desprovidos de pelo, no entanto, são incapazes de rejeitar transplantes de doadores não-histocom-

patíveis e até mesmo de transplantes xenogênicos (Figura 3). Essa característica, que é determinada pela ausência de timo, permite a utilização destas linhagens como receptoras de células e de tecidos humanos, e permitem, por exemplo, o teste de drogas em neoplasias humanas em um sistema *in vivo*.

A utilização de técnicas para obtenção de linhagens com mutações induzidas (transgênicas, *knockouts* e mutações induzidas por agentes químicos e físicos) vem gerando modelos para estudo de diversas patologias encontradas em seres humanos, abrangendo a investigação de mecanismos da patogênese das doenças, assim como a busca de novos tratamentos, o teste de drogas e a terapia gênica. Modelos de doenças, como fibrose cística, lupus eritematoso sistêmico e síndrome de Down, entre outras, além de inúmeras linhagens que apresentam distúrbios comportamentais, já estão disponíveis. Camundongos defici-



Figura 3. Camundongos BALB/c nu/nu (nude). Esses camundongos apresentam ausência de pêlo e um quadro de imunodeficiência por possuírem um timo atrofiado e, por consequência, ausência de linfócitos T. Eles podem ser obtidos do acasalamento de animais imunocompetentes: mães heterozigotas (BALB/c nu/+) e pais BALB/c nu/nu transplantados com timócitos de BALB/c normais



Figura 2. Transplante heterotópico de coração singênico. O coração de um camundongo BALB/c neonato foi removido e implantado na orelha de um camundongo adulto. Após alguns dias, pode-se observar a pulsação do tecido cardíaco na orelha do camundongo transplantado, evidenciando a aceitação do enxerto. Esse modelo permitiu demonstrar a ação patogênica de linfócitos auto-reativos provenientes de camundongos com doença de Chagas experimental (Ribeiro dos Santos et al, 1992)

entes em interferon-gamma (IFN- γ knock outs) são incapazes de controlar a infecção por patógenos como o *Trypanosoma cruzi*, enquanto que camundongos com o mesmo genótipo e que expressam esse fator, sobrevivem à infecção (Figura 4).

A conclusão do projeto genoma humano resultou em um número enorme de seqüências gênicas cujas funções permanecem desconhecidas. Nesse sentido, o camundongo é o modelo experimental de escolha para estudos da função gênica em mamíferos. A mutagênese de camundongos é uma metodologia poderosa no estudo sistemático da genética de mamíferos, e tem sido amplamente empregada, gerando um grande número de novas linhagens. No entanto, se levarmos em conta que, provavelmente, conhecemos mutações em apenas talvez um a dois por cento dos genes de mamíferos, estima-se que, em um futuro próximo, haverá um

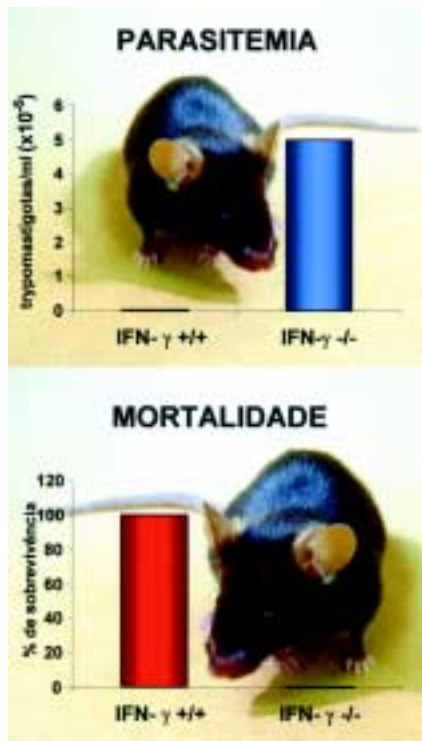


Figura 4. Infecção de camundongos C57Bl/6 normais e *knockouts* para interferon-g por *Trypanosoma cruzi*. Parasitemia (17 dias pós-infecção) e mortalidade (indiretamente expressa como percentagem de animais sobreviventes 20 dias pós-infecção), após inoculação de 100 tripomastigotas de uma cepa de *T. cruzi* de baixa virulência, em camundongos selvagens (IFN-g +/+) ou deficientes de interferon gama (IFN-g -/-). Esses resultados demonstram a participação do interferon g na defesa contra o *T. cruzi* (Soares et al., Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, dados não publicados)

aumento assustador do número de linhagens geneticamente modificadas disponíveis para investigações.

Duas metodologias têm sido empregadas com o objetivo de induzir novas mutações em genes de camundongos, com vistas a compreender suas funções: a transgênese e a utilização de agentes mutagênicos. A primeira funciona pela indução de recombinações sítio-específicas de uma seqüência gênica em células

embrionárias, de onde pode-se obter mutantes nulos (*knockouts*) de forma dirigida para o gene alvo. A outra metodologia, que tem sido sistematicamente empregada por alguns grupos, induz mutações por meio de agentes mutagênicos, como a etilnitrosurêia (ENU), que geram de forma aleatória um grande número de mutantes, que podem ser triados desde o seu nascimento pelos fenótipos apresentados, pela observação de defeitos visíveis quanto à atividade motora e por modificações hematológicas e bioquímicas, através da análise de amostras de sangue.

BANCO DE EMBRIÕES DE CAMUNDONGOS

A criação de animais de experimentação é cara e laboriosa, e a manutenção de linhagens como colônias abertas apresenta um risco de perda das mesmas por contaminação genética, seja por acidentes, por doenças ou por diminuição da fertilidade. Tendo em vista que a maioria dos biotérios de experimentação não tem condições de manter um grande número de linhagens diferentes e de desenvolver seus projetos de pesquisa simultaneamente, a implantação de bancos de embriões de camundongos é de fundamental importância para a expansão dos recursos disponíveis para a pesquisa, sobretudo no Brasil.

A descoberta de que embriões de mamíferos sejam capazes de se desenvolverem em um organismo completo quando transferidos para mães de aluguel fez aflorar as vantagens do armazenamento de embriões. A criopreservação de embriões de camundongos foi alcançada com sucesso em 1972, e hoje é uma metodologia difundida e a melhor e mais segura forma de preservação do patrimônio genético murino (Figura 5). Atualmente, vários biotérios no mundo possuem bancos de embriões de camundongos transgênicos e *knockouts* já estabelecidos. Alguns desses, como o Jackson Laboratory (Maine, EUA), o FESA-Mammalian Research Center (Oxfordshire, Reino Uni-



Figura 5. Embrião de camundongo em estágio de duas células, observado através de microscopia com contraste de fase (Soares et al., Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador)

do) e a Special Breeding & Species Preservation Section do National Institutes of Health (Maryland, EUA) possuem grandes coleções de linhagens murinas criopreservadas.

A criopreservação de espermatozoides de várias espécies animais é uma metodologia que tem sido realizada extensivamente já há várias décadas. No entanto, o congelamento de espermatozoides de camundongos só foi alcançado com sucesso na década de 1990. Uma grande quantidade de espermatozoides pode ser obtida do epidídimo de um único macho, o suficiente para fecundar pelo menos 500 óvulos. Embora seja uma técnica relativamente simples e de baixo custo, existe uma variação na eficiência de congelamento dependente do genótipo da linhagem. Além disso, somente o genoma haplóide é conservado, sendo necessário também o congelamento de ovócitos da mesma linhagem, enquanto que o congelamento de embriões permite a preservação de um genoma completo. As técnicas de congelamento de ovócitos e de tecido do ovário são metodologias já alcançadas com sucesso, mas que não são ainda muito difundidas.

No Brasil, poucos são os biotérios que praticam o congelamento de embriões e mantêm coleções de linhagens de camundongos. Dada a

dificuldade de importação de animais, a criação de uma estrutura para a preservação de linhagens mutantes já existentes, de interesse dos grupos de pesquisa no Brasil, é fundamental para a expansão dos recursos genéticos nessa área. Além disso, permitirá a preservação de novas linhagens que possam ser geradas como fruto do desenvolvimento de técnicas de transgênese e mutagênese no país, que já vêm sendo realizadas, porém de forma incipiente.

A criação de uma estrutura para manipulação e criopreservação de embriões de camundongos poderá também facilitar a aquisição de novas linhagens. O envio internacional de camundongos vivos é inconveniente, caro e sujeito a problemas burocráticos e mau manuseio. Além disso, a introdução de linhagens novas em biotérios pode trazer patógenos capazes de contaminar as colônias já estabelecidas e serem difíceis de ser eliminados, como o vírus Sendai e o vírus da hepatite murina. A importação de embriões criopreservados é uma alternativa relativamente fácil e segura, e previne o risco de transferência de patógenos de um biotério para outro.

Atualmente, o Brasil conta com bons biotérios de criação, com climatização e filtração absoluta de ar, que permite a produção de animais livres de patógenos (SPF), como, por exemplo, o biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), na Bahia (Figura 6), onde está sendo implantado um banco de embriões de camundongos transgênicos e *knockouts*. Esse banco permitirá preservar e distribuir entre pesquisadores no Brasil as linhagens já adquiridas pela FIOCRUZ e por grupos de pesquisa de outras instituições. No entanto, nem sempre a qualidade dos biotérios de experimentação acompanha a dos biotérios de criação, sendo necessária a manutenção de animais em micro-isoladores e fluxos laminares. Uma outra variável que deve ser controlada diz respeito às condições do transporte de animais do biotério de criação para o de



Figura 6. Detalhe de sala do biotério de criação do CPqGM, mostrando um dos isoladores em que são criados camundongos imunodeficientes. No primeiro trimestre de 2001, 18 linhagens isogênicas estão sendo mantidas nesse biotério, incluindo camundongos atímicos, com base gênica de BALB/c (BALB/c nu/nu), C57Bl/6 (C57Bl/6 nu/nu) e Swiss (Swiss nu/nu), camundongos *knockouts* para interleucina-4, interleucina-12, interferon- γ receptor para interferon- γ sintetase induzível de óxido nítrico, CD28 e fator de ativação plaquetária, além de camundongos que desenvolvem espontaneamente lupus eritematoso sistêmico (NZB x NZW) ou anemia hemolítica autoimune (NZB)

experimentação. O Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz é ímpar, no Brasil, por ter eliminado essa variável através da construção de uma janela intertravada liga as áreas de criação e de experimentação, pela qual os animais são transferidos sem perder as condições SPF.

A implantação de bancos de embriões murinos no Brasil é de fundamental importância para que possamos realizar, dentro de padrões internacionais e com a qualidade necessária, pesquisas fundamentais sobre patogenia e mecanismos de proteção em doenças endêmicas, além de avaliações da atividade farmacológica de novas drogas, sobretudo das obtidas de produtos naturais vegetais.

BIBLIOGRAFIA

Glenister PH, Thornton CE (2000) Cryoconservation – archiving for the future. *Mamm. Genome* 11: 565-571.

Hogan G, Beddington R, Constantini F, Lacy E (1994) *Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual*. 2ª edição, Cold Spring Harbor Laboratory.

Nakagata N (2000) Cryopreservation of mouse spermatozoa. *Mamm. Genome* 11: 572-576.

Nolan PM, Peters J, Strivens M, Rogers D, Hagan J, Spurr N *et al* (2000) A systematic, genome-wide, phenotype-driven mutagenesis programme for gene function studies in the mouse. *Nat. Genet.* 25: 440-443.

Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P (1972) Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C . *Science* 178: 411-414.

Ribeiro dos Santos R, Rossi MA, Laus JL, Silva JS, Savino W, Mengel J (1992) Anti-CD4 abrogates rejection and reestablishes long-term tolerance to syngeneic newborn hearts grafted in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *J. Exp. Med* 175: 29-39 1992.