



LUIZ AUGUSTO CORRÊA PASSOS

“O USO DA REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA NA
MONITORAÇÃO GENÉTICA DE LINHAGENS ISOGENICAS DE
CAMUNDONGOS UTILIZADAS EM IMUNOLOGIA”

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato a
Luiz Augusto Corrêa Passos
e aprovada pela Comissão julgadora.

4/2/97

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas, como
parte dos pré-requisitos para obtenção do
título de Mestre em Ciências Biológicas na
área de concentração em Imunologia.

Orientador : Prof. Dr. HUMBERTO DE ARAÚJO RANGEL
1997

5496

PREÇO	R\$ 15,00
DATA	22/05/97
Nº CPD	

CM-00098000-3

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

P268u Passos, Luiz Augusto Corrêa
O uso da reação de polimerase em cadeia na monito-
ração genética de linhagens isogênicas de camundongos
utilizados na imunologia / Luiz Augusto Corrêa Passos -
Campinas, SP : [s.n.], 1997.

Orientador: Humberto de Araújo Rangel.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Reação em cadeia de polimerase. 2. DNA polimerase.
3. Imunologia. 4. Camundongo como animal de
laboratório. 5. Engenharia genética. I. Rangel, Humberto
de Araújo. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

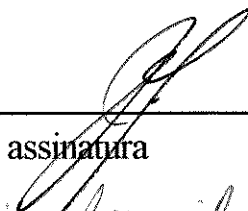
APROVADA

LOCAL E DATA: Campinas, 04 de fevereiro de 1997.

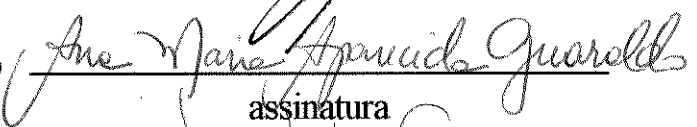
BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

Prof. Dr. Humberto de Araújo Rangel


assinatura

Profa. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo


assinatura

Profa. Dra. Júlia Keiko Sakurada


assinatura

SUPLENTE

Prof. Dr. Irineu José Barsanti Camargo


assinatura

À
Neiri, Leticia e Otávio
*Meus mais importantes estímulos,
minha dedicação e carinho.*

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP

À Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

Ao Institut National de La Santé et de La Recherche Médicale
INSERM - Paris - França

Ao Institut Pasteur de Paris - Laboratório de genética de mamíferos

Ao Kernforschungsanlage - KFA - Jülich - Alemanha

Ao Zentralinstitut für Versuchstierzucht - ZfV - Hannover - Alemanha

Ao Centro de Bioterismo - CEMIB/UNICAMP

Ao Departamento de Imunologia e Microbiologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas

AGRADECIMENTOS

A meus pais, Luiz e Erothides pelo carinho, compreensão e principalmente pela sabedoria de ter me ensinado a acreditar em mim mesmo.

Ao Prof. Dr. Humberto de Araújo Rangel, pela orientação deste trabalho e pelo apoio para vencer os múltiplos desafios criados na implantação do Cemib/Unicamp.

Ao Bioterista brasileiro de coração, Prof. Dr. Jean-Louis Guénet, que nunca mediu esforços para contribuir com a equipe do Cemib/Unicamp.

À Profa. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo, pela profunda amizade e companheirismo sempre compartilhados e principalmente pelo imprescindível apoio e estímulo na elaboração deste trabalho.

Aos Professores Doutores Júlia Keiko Sakurada e Irineu José Barsanti Camargo pelas críticas e sugestões apresentadas na redação do documento.

Aos estagiários do laboratório de Genética e Criopreservação de Centro de Bioterismo, Luiz Afonso Pires e Viviani Liotti Dias pela importante colaboração e em especial à Ana Cristina Prado Veiga pelo abnegado esforço e decisiva participação na implantação das técnicas de DNA.

Aos amigos do Conselho Técnico do Cemib, Maria Inês Gomes Tojal Schiavinatto de Oliveira, Delma Pegolo Alves, Rovilson Gilioli, Armando Ferreira Lima Filho, Lenira Aparecida Guaraldo de Andrade, Daniele Masselli Rodrigues e Sônia Cano Montebelo Rachel, minha gratidão pelo apoio.

A todos os funcionários do Centro de Bioterismo, sempre dispostos a colaborar e a aceitar importantes desafios para o engrandecimento da Ciência de Animais de Laboratório.

A todos os professores e colegas de pós-graduação em Imunologia que de diferentes maneiras colaboraram para a viabilização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1 Animais	13
3.2 Desenvolvimento de unidades isoladoras	15
3.3 Manutenção das colônias de Fundação importadas, em unidades isoladoras.	15
3.4 Criopreservação de embriões	16
3.5 Testes de acasalamento	18
3.6 Teste de histocompatibilidade	18
3.7 Marcadores bioquímicos	19
3.8 Isolamento do DNA	20
3.8.1 Extração fenólica das amostras de DNA a partir do baço	20
3.8.2 Extração das amostras de DNA a partir da orelha, por precipitação alcóolica	21
3.8.3 Análise das Amostras de DNA	22
3.8.4 Reação de PCR	23
3.8.4.1 Amostras de DNA padrão	23
3.8.4.2 Amplificação das amostras de DNA padrão	25
3.9 Amostras de DNA de camundongos de Instituições Nacionais	27
3.9.1 Amplificação das amostras de DNA dos camundongos de Instituições Nacionais	28

	Pag.
4. RESULTADOS	30
4.1 Isolamento genético das matrizes das Colônias de Fundação	30
4.2 Estabelecimento do banco de embriões	33
4.3 Estabelecimento do banco de DNA	34
4.3.1 Monitoração genética por marcadores bioquímicos	34
4.3.2 Caracterização do DNA padrão	35
4.3.3 Atividade em PCR das amostras padrão mantidas no Cemib/Unicamp	37
4.4 Avaliação genética de linhagens de camundongos mantidas em algumas Instituições brasileiras	38
5. DISCUSSÃO	46
6. RESUMO E CONCLUSÕES	59
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
8. ANEXOS	74

SUMÁRIO DAS TABELAS

	Pag.
Tabela 1: Origem das matrizes de Colônia de fundação de camundongos do Cemib / Unicamp	13
Tabela 2: Linhagens isogênicas de camundongos utilizadas para obtenção de amostras para análise de marcadores bioquímicos e de DNA padrão.	14
Tabela 3: Primers utilizados com amostras de DNA padrão e sua localização no cromossomo	23
Tabela 4: Sequência de nucleotídios para os primers utilizados e peso molecular dos produtos formados	24
Tabela 5: Primers utilizados na monitoração genética de linhagens padrão de camundongos mantidas no Cemib/Unicamp e sua respectiva localização no cromossomo.	25
Tabela 6: Sequência de nucleotídios dos primers utilizados	27
Tabela 7: Localização e peso molecular (bp) dos marcadores utilizados na monitoração das linhagens isogênicas das Instituições	28
Tabela 8: Distribuição da cor de pelagem observada nos camundongos da segunda geração (C57BL/6 x A/J) F2	32

Tabela 9: Recuperação de embriões congelados da linhagem BALB/c	33
Tabela 10 : Caracterização de locus dos marcadores bioquímicos Mod-1, Gpi e Hbb dos animais utilizados para o estabelecimento de padrão de DNA	34
Tabela 11 : Concentração e coeficiente de pureza das amostras de DNA padrão das diferentes linhagens de camundongos.	35
Tabela12 :Tamanho relativo dos produtos de PCR do DNA das linhagens de camundongo padrão utilizando-se diferentes marcadores.	36

INTRODUÇÃO

Estamos de tal modo acostumados ao avanço científico e tecnológico atual da área médico biológica, que esquecemos que há pouco mais de um século as epidemias de cólera, peste, varíola, tifo exantemático, sífilis, varriam os continentes em ondas sucessivas, dizimando as populações humanas, influenciando no destino das nações, na história das suas mentalidades e nas suas culturas.

O crescimento exponencial da pesquisa experimental, no último século, revelando importantes descobertas nas áreas de Microbiologia, Imunologia, Fisiologia, Farmacologia, Genética, Nutrição, etc, foi de tal modo decisivo para a sociedade que induziu alterações profundas em suas concepções e conduta (109).

Embora a utilização de animais em ciências tenha sido concebida na Grécia antiga, o impulso definitivo para a sua utilização como modelo de experimentação sómente ocorreu no século XVII, com a “Revolução Científica”, onde descobertas como a circulação sanguínea instigaram o interesse pela fisiologia, dependente de animais e agente acelerador do uso da viviseção (70).

Vários fatores contribuíram para as mudanças históricas da sociedade. Essa mudança de atitude frente a vida, a confiança e fé transferidas do curandeirismo para os serviços médicos, o crédito na eficácia das vacinas, soros e fármacos que, como a penicilina, foram usados pela primeira vez em seres humanos há apenas 50 anos e para outros, como antidepressivos e drogas psicotrópicas, de uso bem mais recente, são consequência, sem sombra de dúvida do uso intensivo de animais de laboratório como modelo experimental. Durante o século XIX, com o surgimento da “pesquisa biomédica moderna” áreas existentes até então de forma ordinária, como a Fisiologia, Farmacologia, Imunologia, etc., iniciaram um processo de reorganização sendo então estabelecidas como disciplinas, e, por conseguinte, dependentes de animais de experimentação (70).

A investigação médico biológica foi e continua sendo um fator decisivo para a nossa atual confiança na terapêutica médica. Confiamos porque sabemos que antes de experimentados pela primeira vez no ser humano, um droga, um ato ou uma simples recomendação foram investigados em milhares de animais de laboratório de diferentes espécies (72). A nossa formação cultural repele com veemência a idéia de que seres humanos sejam utilizados em experiências, como as realizadas em campos de concentração de judeus, durante o último conflito mundial, e exige que, qualquer droga, qualquer procedimento, antes de usado no homem seja ensaiado em animais dentro de condições que não provoquem dor ou sofrimento desnecessários (Cruelty to Animals - act, 1876).

Embora espécies como anfíbios estejam entre os primeiros modelos utilizados nas pesquisas médicas e biológicas no século XIX, no século XX os mamíferos, especialmente camundongos e ratos, foram eleitos como modelo para as diversas áreas da pesquisa biomédica, devido aos seus parâmetros biológicos uma vez que as diferentes fases do desenvolvimento animal poderiam ser acompanhadas (72). Em decorrência de características particulares de cada espécie, foram estabelecidas como referência para o teste de drogas e procedimentos o uso de 5 espécies: camundongos, ratos, hamster, cobaio e coelho (79).

Mais recentemente, o pós guerra da década de 50 desencadeou um acentuado avanço nas pesquisas biomédicas aumentando a necessidade de animais de laboratório. Willian Paton em sua obra acerca da importância do animal de experimentação no desenvolvimento da Ciência Biomédica moderna, relaciona de forma clara o número de animais utilizados e a melhora na qualidade de vida das populações. Segundo o autor, entre 1890 e 1980, o número de experimentos que utilizavam animais saltou de pouco mais de 1000 para mais de 1000.000 em 1980.

Os benefícios decorrentes deste uso se estendem desde a descoberta da vacina tifóide até o desenvolvimento de anticorpos monoclonais e a biotecnologia na década de 80. Como consequência, entre 1940 e 1970, a morte de indivíduos entre 45 e 64 anos de idade por doenças hipertensivas, reduziu de 300 por mil em 1940 para cerca de 3 vezes menos em 1970. No caso de outras doenças como a pneumonia, o levantamento realizado pelo autor aponta para uma queda de 10 vezes no mesmo período para indivíduos da mesma faixa etária (72).

Não obstante a questão numérica do uso dos animais, foi decisiva a criação de uma Ciência voltada para os modelos animais. Como toda a ciência, esta também é pluridisciplinar e reuniu especialistas das mais diferentes áreas. Os profissionais deveriam concentrar seus esforços tanto no desenvolvimento de pesquisa nesta e em áreas correlatas, como também possibilitar a padronização dos modelos. Uma vez estabelecida, esta nova área exigiu esforços para que Centros de Pesquisa equipassem seus biotérios e investigassem a biologia desses animais (11). Alguns Centros (Wistar Institute, 1894; Jackson Laboratories, 1928) intensificaram seus programas de criação transformando-se em Centros de Referência para Animais de experimentação. Outros foram especificamente criados para este fim, como o Laboratory Animal Center, em 1947. Em decorrência deste esforço, os modelos passaram a ser padronizados do ponto de vista sanitário, genético e ambiente. Outro importante exemplo que na atualidade mantém posição de destaque é o National Institute of Health (N.I.H.) criado na década de 40 em Bethesda, onde grande número de linhagens é produzido sob o mais rígido controle.

Por outro lado, no panorama nacional, é recente o esforço de grupos da comunidade científica para a implantação de Centros de referência que possam atender a demanda da pesquisa biomédica com animais certificados. Apesar do

elevado investimento inicial necessário à implantação de uma produção de animais de laboratório com alto padrão genético, sanitário e de ambiente, e embora o tempo para a qualificação do pessoal técnico e desenvolvimento tecnológico ser relativamente longo, a médio prazo o custo se torna significativamente reduzido, uma vez que minimiza as perdas decorrentes de contaminações nas colônias, necessidade de elevado número de animais por experimento, perdas de resultados experimentais, etc. (20).

A década de 60 cristalizou nos países desenvolvidos, esta nova mentalidade, com consequências sobre todo o sistema de produção e cuidados com os modelos animais (9, 24, 64).

Considera-se que a resposta de um animal de experimentação depende de uma gama enorme de fatores que podem ser agrupados em fatores do ambiente, sanitários e genéticos. Aspectos relacionados ao microambiente (tipo de cama, ração, ventilação, etc) e macroambiente (ruídos, temperatura, umidade, luminosidade, etc) quando inadequados, podem atuar como agentes causadores de stress propiciando um desequilíbrio fisiológico, metabólico, etc, tornando o animal impróprio como modelo experimental (14, 28). Níveis elevados de amônia, oriundos de uma taxa baixa de renovação de ar ou de uma elevada densidade populacional, acarretam problemas pulmonares importantes (54,88); mudanças na temperatura, ruídos, manejo, etc, podem também alterar o estado fisiológico dos animais, influenciando na pesquisa (20, 57).

Quanto aos aspectos sanitários, é grande o impacto do estado microbiológico do animal sobre os resultados na pesquisa (96). Alguns agentes são relevantes na capacidade de induzir alterações nos resultados experimentais, tais como, Sendai virus, virus da hepatite murina (MHV), *Mycoplasma pulmonis*, *Mycoplasma arthritidis*, *Bacillus piliformis* (69).

Mesmo em países desenvolvidos, colônias comerciais de ratos e camundongos apresentam prevalência alta de agentes infecciosos, exigindo uma preocupação constante com programas de monitoração sanitária. Para alguns agentes, como MHV e Sendai, levantamentos soroepidemiológicos realizados em 1984, evidenciam que estes agentes continuam presentes na maioria das colônias há pelo menos 2 décadas (19).

O primeiro levantamento de infecções virais realizado em 17 Instituições brasileiras, indica que a prevalência das infecções não é muito diferente da observada há algumas décadas em outros países, sendo o Corona vírus o de maior prevalência (37).

Se a introdução de agentes infecciosos, ainda que involuntária, em uma colônia de animais é prejudicial a pesquisa em áreas como a Farmacologia, Fisiologia, etc, na Imunologia ela é desastrosa. Os critérios para a avaliação dos efeitos de um episódio como este, em um passado não muito remoto, eram apenas os índices de mortalidade e reprodução. Assim que a doença era aparentemente eliminada, os animais voltavam a ser utilizados na pesquisa. Porém, pouco ou nada se sabia sobre a relação parasita hospedeiro para agentes virais ou bacterianos, capazes de causar alterações fisiológicas ou capazes de interferir por exemplo em seu sistema imune. Sabemos hoje que mesmo naquelas infecções em que os animais não morrem, a fisiologia dos animais encontra-se profundamente alterada, como no caso do vírus da Coriomeningite Linfocitária (L.C.M.) vírus da Desidrogenase Láctica (L.D.H.), ou dos Corona vírus (MHV, Rat coronavirus, Vírus da Sialodacrioadenite) (83). O vírus da Desidrogenase Láctica, por exemplo, quando da fase aguda da infecção, promove a ativação de macrófagos, supressão da resposta celular interferindo na resistência a outras doenças como malária e Listeriose, bem como diminuindo a reação de hipersensibilidade tardia e a reação a

aloenxertos (80). Camundongos susceptíveis ao vírus MHV-3, apresentam involução tímica (38, 80) e já foi descrito em BALB/c, evolução de necrose hepática com anormalidades na microcirculação do fígado, bem como falhas na ativação de linfócitos T in vivo e in vitro (74). Outro relato importante da interferência deste agente é a imunossupressão associada a profundas alterações em medula e timo que altera, por exemplo, o quadro da doença de Chagas experimental (76, 97).

Os estudos da resposta imune utilizando diferentes espécies de animais, mostrou que o tipo de resposta é dependente não só do animal como da diferença entre linhagens (107). Algumas linhagens isogênicas tais como C57BL/10ScSn, diferem consideravelmente na capacidade de produzir anticorpos a antígenos particulares. Nesta linhagem a baixa produção de IgG está provavelmente relacionada a alterações funcionais nas células apresentadoras de antígenos (92).

A escolha errada de uma linhagem mesmo próximamente relacionada, pode ter reflexo sobre nossas conclusões experimentais. Um outro exemplo é a produção de INF de linfócitos oriundos do baço de camundongos isogênicos C57BL/10ScSn e C57BL/10ScCr comparada por Yaegashi Y, & cols. O autor constata que quando estimuladas com Concanavalina A e anticorpo monoclonal CD3, as células de ambas as linhagens produzem altos níveis de INF. Contudo, quando estimuladas com bactérias gram negativas, a linhagem ScSn produz INF, enquanto a ScCr não, demonstrando a perda da capacidade em produzir INF em decorrência da depleção de macrófagos existente na linhagem Sn (108).

O “background” genético dos animais está diretamente relacionado ao fenômeno da resistência a infecções promovidas por agentes como *Plasmodium*

falciparum, *Toxoplasma gondii*, *Schistosoma mansoni*, *Trichinella spiralis*, *Leishmania sp.*, etc. (66).

Na verdade, a imunologia e a genética sempre compartilharam o seu desenvolvimento sob vários aspectos. Os efeitos da reação a transfusões esclarecidos a partir das observações de Landsteiner que soros de alguns indivíduos aglutinavam hemácias de outros, abriram importante espaço para a relação entre genética e imunologia. Desde o início do século, geneticistas buscavam a possibilidade de adotar métodos imunológicos para estudos de herança genética. Os estudos iniciais de Little em 1909 acerca do implante de tumores e suas conclusões de que o sucesso do implante dependia do grau de proximidade entre o doador e receptor, estimularam os primeiros esforços para o estabelecimento de linhagens isogênicas importantes no estudo de doenças constitucionais, metabólicas, imunológicas, etc. (1).

No primeiro quarto do século, pesquisadores estabeleceram que o aceite de tumor de um animal para outro dependia de genes que a princípio foram entendidos como genes de suscetibilidade que variavam em função do tumor e do hospedeiro. Em alguns casos, dezenas de genes estariam relacionados com o crescimento do tumor e em outros casos, dois a três genes. Outros pesquisadores sugeriram que os mesmos genes estariam também envolvidos no controle da compatibilidade dos tecidos em geral. Foi com esta idéia que Landsteiner & Chase na década de 40, interessados no papel dos anticorpos na dermatite de contato, descobriram ser esta doença um fenômeno mediado por células (linfócitos). Suas conclusões permitiram confirmar que tanto o fenômeno de dermatite de contato quanto a hipersensibilidade tardia são mediados por células. Conclusão semelhante foi alcançada por Medawar (63), que trabalhando com animais geneticamente definidos, pode elucidar a natureza da rejeição a aloenxertos caracterizando-a

como hipersensibilidade retardada, abrindo espaço para que Mitchison concluísse que a imunidade a aloenxertos podia ser transferida para outros animais com a mesma carga gênica, através dos linfócitos. Portanto, com Medawar, Gorer e Snell temos um marco na década de quarenta com a descoberta do complexo de histocompatibilidade, que passou a ser conhecido como um conjunto de genes próximos de grande importância no fenômeno de rejeição. Posteriormente, outros pesquisadores como Dausset, Von Road, Rose Pay, etc, descobriram um complexo similar em outras espécies bem como no homem., sedimentando a imunogenética e criando a expressão “Major Hipersensitivity Complex” (MHC) (5, 53).

O sucesso alcançado por Snell no cruzamento de linhagens isogênicas colaborou não só com a descoberta dos haplótipos de histocompatibilidade, mas permitiu o estabelecimento de novas metodologias de monitoração genética, como o uso de soro polivalente e anticorpos monoclonais (29,30). Por outro lado, esta relação se intensificou com o uso de modelos portadores de mutações espontâneas que tinham efeito sobre a capacidade do animal controlar infecções.

O estabelecimento destes modelos propiciou o desenvolvimento de um elenco enorme de metodologias, tais como repopulação com células humanas, infecção com vírus HIV (90). O exemplo mais difundido é a mutação autossômica recessiva nude ocorrida originalmente na linhagem BALB/c, que conduz a uma importante redução de linfócitos T. Este mutante possibilitou um enorme avanço na elucidação do papel das células T em estudos imunológicos (90). Algumas vezes as mutações apresentam um caráter de severidade muito acentuado impossibilitando a manutenção dos animais em ambiente normal, tal como ocorre em camundongos mutantes Scid, e “Knockout” Rag-1 e Rag-2 que necessitam de isoladores para sua sobrevivência (13, 71).

Com o advento da linhagem Scid, uma gama de importantes fenômenos relacionados a resposta imune, estão sendo parcialmente compreendidos, como por exemplo, a análise da participação do sistema imune na ontogenia da relação materno fetal, (22) a elucidação de mecanismos de ativação de macrófagos e de produção de INF independente da presença de linfócitos T, (8), a regulação e organização do sistema hematopoético (58) e no estudo de tumores humanos em associação com a linhagem nude (105).

Atualmente pesquisas imunológicas realizadas nos grandes Centros de pesquisa adotam tecnologias desenvolvidas pela Ciência de animais de laboratório, tais como a manipulação de embriões para o desenvolvimento de novos modelos (transgênese) e criopreservação de linhagens, o controle sanitário para avaliar a interferência de patógenos na pesquisa, o controle genético para caracterização de linhagens cujo genoma pode interferir nos resultados experimentais (6, 51, 14).

Desde a produção do primeiro camundongo transgênico no final da década de 80, a imunologia adquiriu nova ferramenta genética para a investigação de doenças humanas. Desta forma, deve ser ressaltado o estabelecimento de linhagens que tem seu “background” genético original modificado por manipulação (transgênese) segundo a conveniência da imunologia. Um exemplo é a linhagem FVB transgênica para o gene Bcl-2 relacionado com o fenômeno de morte celular programada (apoptose).

Atualmente a imunologia adota modelos produzidos pela manipulação genética (“knockout”) na busca do esclarecimento de vários fenômenos relacionados com partes ou com o sistema imune como um todo (105, 109). Taverne (95) descreve alguns efeitos da transgênese e de camundongos “knockout” na imunologia; produtos de manipulação gênica que acarretam

defeitos em receptores de citocinas com impacto celular , humoral e resistência a infecções experimentais (90, 95).

A partir dos primeiros esforços de Bailey para a produção de linhagens recombinantes isogênicas, uma nova possibilidade se abre para o estudo da relação entre a resistência e suscetibilidade a determinadas doenças e o efeito do “background” genético (7, 65, 25).

Entretanto, a utilização de linhagens recombinantes congênicas com o propósito de esclarecer fenômenos relacionados com a genética da resistência a doenças, embora de grande valia, apresenta a desvantagem de ser extremamente lenta, onerosa e com riscos de deriva genética ou contaminação accidental.

Por outro lado, as metodologias tradicionais utilizadas na análise do genoma de animais, ou na monitoração genética para assegurar a autenticidade das linhagens, em geral demandam tempo, dinheiro e experiência na análise dos resultados. Contrariamente, a reação de polimerase em cadeia (PCR) como técnica de monitoração não apenas oferece a possibilidade de avaliação do “background” genético, mas possibilita também o estudo de uma ampla variedade de enfermidades. A identificação de regiões do cromossomo envolvidas na susceptibilidade a doenças, tais como diabetes, hipertensão, plasmocitomas, esclerose múltipla e outras, tem se tornado realidade mediante a utilização de marcadores polimórficos de DNA (microstálites) em híbridos F2 de linhagens com fenótipos distintos. Utilizando primers especificamente selecionados para a análise de recombinação entre animais híbridos programadamente acasalados, é possível identificar e localizar genes cujo produto de expressão pode esclarecer fenômenos imunológicos ou não relacionados com a resistência (75). Bureau & cols., numa série de trabalhos (4, 16, 17, 18, 35) não apenas identifica e mapeia, mas também insere o gene da resistência ao Virus murino de Theiler (virus da

encefalomielite murina) em uma linhagem transgênica FVB que se torna resistente à infecção, não desenvolvendo as lesões típicas da esclerose múltipla, ressaltando que o desenvolvimento da pesquisa para estudos do determinismo genético da resistência a infecções depende da garantia do padrão genético de seus múltiplos modelos.

Atualmente, os programas de estudos em genética desenvolvidos em importantes Centros de pesquisa de países do primeiro mundo, utilizam as técnicas de amplificação de fragmentos de DNA, tanto na identificação de genes e a sua associação com as outras espécies, como na monitoração genética de linhagens de camundongos e ratos geneticamente certificadas (55, 87, 61). Em contraste, nos países em desenvolvimentos como o Brasil, poucas Instituições de pesquisa podem dispor de animais geneticamente definidos.

A rotina de monitoração genética de camundongos realizada com a técnica de reação da polimerase em cadeia (PCR) implantada no Cemib/Unicamp, nos estimulou a utilizá-la na avaliação de amostras de Colônias de fundação de outras Instituições que mantêm programas de pesquisa na área de imunologia.

OBJETIVO

O presente trabalho tem por objetivo principal investigar a identidade genética em 5 linhagens isogênicas de camundongos, mantidas em algumas Instituições brasileiras para estudos em imunologia, através da amplificação de microsátélites polimórficos presentes em moléculas de DNA de alto peso molecular, utilizando a reação de polimerase em cadeia (PCR).

3.1 Animais

No presente trabalho foram utilizados os seguintes grupos de animais:

Grupo 1 - Matrizes de colônias de camundongos certificadas importadas do Instituto Pasteur de Paris (França) e do Zentral Institut für Versuchstierzucht de Hanover (Alemanha). Essas matrizes estão indicados na tabela 1 e foram mantidas em unidades isoladoras flexíveis, para início da Colônia de Fundação no Cemib/Unicamp.

Tabela 1: Origem das matrizes de Colônia de fundação de camundongos do Cemib/Unicamp

LINHAGEM	INSTITUIÇÃO DE ORIGEM
BALB/c AN	Zentral Institut für Versuchstierzucht
BALB/c nu/nu	Institut Pasteur - Paris
C57BL/6	Zentral Institut für Versuchstierzucht
C57BL/6 nu/nu	Zentral Institut für Versuchstierzucht
C57BL/6 bg/bg	Institut Pasteur - Paris
C57BL10/ScCr	Institut Pasteur - Paris
C57BL10/ScCr nu/nu	Institut Pasteur - Paris
CB17 Scid/Scid	Institut Pasteur - Paris
CB17 +/-	Institut Pasteur - Paris
CBA/Han	Zentral Institut für Versuchstierzucht
CBA/N Xid	Institut Pasteur - Paris
C3H/He nu/nu	Zentral Institut für Versuchstierzucht
NOD	Hospital Necker - Paris

Grupo 2 - camundongos de diferentes linhagens isogênicas, oriundos de colônias geneticamente monitoradas, mantidas no Instituto Pasteur. Estes animais estão indicados na tabela 2 e foram avaliados com marcadores bioquímicos e utilizados na obtenção das amostras de DNA padrão.

Tabela 2: Linhagens isogênicas de camundongos utilizadas para obtenção de amostras para análise de marcadores bioquímicos e de DNA padrão.

Linhagem	Fenótipo da pelagem
BALB/c	albino
C57BL/6	preto
CBA	agouti
C3H/HeJ	agouti
DBA/1	marrom diluído
DBA/2	marrom diluído
DDK	albino
SJL/J	albino
129/Sv	agouti

Grupo 3 - camundongos das linhagens CBA, BALB/c, C57BL/6, C3H/He e A/J, obtidos de diferentes Instituições brasileiras indicadas como A, B, C, D e E. Estes animais foram utilizados para a investigação da identidade genética de representantes das Colônias de Fundação destas Instituições.

3.2 Desenvolvimento de unidades isoladoras

Isoladores de pressão positiva foram confeccionados em PVC laminar flexível transparente, com 0,30mm de espessura, montados com solda dielétrica realizada na máquina de marca Aratec, modelo S-3000. Todos os materiais utilizados foram de procedência nacional, exceto as mantas filtrantes, capazes de reter 99,99% de partículas com 0,3 μ m de diâmetro, que foram importadas dos EUA.

A integridade do corpo principal do equipamento foi realizada através de testes físicos, no qual o envelope permanece inflado por 3 dias, bem como testes de vazamento por detector de partículas, sensível a gás freon. Foi feito o controle ambiente com análise microbiológica do interior do corpo principal após a esterilização com ácido peracético, através de swab e cultivo em caldo glicosado, caldo tioglicolato e meio líquido sabouroud. Nestes equipamentos foram introduzidas as matrizes importadas do grupo 1.

3.3 Manutenção das colônias de Fundação importadas, em unidades isoladoras.

Matrizes transportadas isoladamente em containers revestidos com manta filtrante de proteção, recém chegadas do país de origem, foram introduzidas em isoladores flexíveis na seção de quarentena. Por medida de segurança, os casais foram introduzidos em isoladores diferentes e mantidos acasalados até que se completassem os 2 primeiros partos. Algumas fêmeas

foram submetidas a acasalamento programado na seção de quarentena e no setor de gnotobiologia para histerectomia. Os neonatos foram transferidos para outro isolador na Colônia de Fundação, onde estavam as fêmeas receptoras importadas de Hanover.

No setor de gnotobiologia, um casal de cada linhagem importada foi introduzido após derivação cesariana, em 3 isoladores diferentes. Os animais foram mantidos em esquema “self perpetuation” conforme descrito por Hedrich (43), no qual a cada 5 gerações, a colônia é reiniciada com descendentes geneticamente monitorados. Todos os casais de cada geração foram acompanhados por mapas genéticos nos quais foram registrados e avaliados heranças de caráter poligênico tais como, número mínimo e máximo de neonatos, número de partos observado durante o período de acasalamento, número de crias desmamadas, intervalo entre o acasalamento e o primeiro parto, intervalo entre partos e número de mortos no período.

Estes dados permitem a avaliação dos índices de produtividade e mortalidade para as diferentes linhagens. Casais foram também separados para teste de acasalamento, para a observação da frequência dos alelos de pigmentação em seus descendentes.

3.4 Criopreservação de embriões

Para a perpetuação do padrão genético original das matrizes importadas (grupo 1), foram utilizados métodos de criopreservação conforme descrito por Hogan & cols. (49), Hedrich e Reetz (45) e Reetz & cols. (77).

Casais das colônias de Fundação foram transferidos para a seção de criopreservação onde as fêmeas foram superovuladas com 5UI de hormônio folículo estimulante - PMSG (Intergonan - lab. Vermie 1000UI) e após 46h foram

injetadas intraperitonealmente com 5UI do hormônio luteinizante - HCG (Primogonyl - lab. Schering 1000UI) para proceder o acasalamento. As fêmeas que apresentaram plug vaginal foram sacrificadas após 24h. e seus ovidutos retirados para a coleta dos embriões. Os embriões foram coletados em placas de petri descartáveis mantidas até o momento do congelamento, em estufa a 37°C, atmosfera de 5% de CO₂ e 99% de umidade em meio de cultura PB1 (anexo 1).

Entre 20 e 40 embriões de 2 a 8 células foram transferidos para minitubos rotulados que continham meio de congelamento com 1,2 propanodiol 1,5M como crioprotetor e em seguida transferidos para um banho refrigerado Haake F3. Após a transferência de todos os minitubos, os embriões foram congelados pela técnica de congelamento em 2 etapas como descrito por Hedrich & Reetz. (45) e em seguida transferidos para o banco de embriões. No momento do descongelamento, os minitubos foram retirados do container com nitrogênio líquido, o meio com os embriões foi recolhido em placas de petri descartáveis e o crioprotetor foi diluído conforme indicado em Hedrich & Reetz. (45). Os embriões foram então transferidos para outra placa com meio isotônico de cultivo e armazenados em estufa de CO₂ até o momento do implante.

O implante dos embriões foi realizado em fêmeas receptoras da linhagem híbrida CB6 anestesiadas com solução de avertin (anexo 2) e acasaladas no dia anterior com machos vasectomizados por cauterização prévia dos canais deferentes. Aproximadamente 10 embriões foram depositados em um dos ovidutos da fêmea receptora. A gestação foi acompanhada até o nascimento.

3.5 Testes de acasalamento

Os testes de acasalamento foram preparados conforme indicado por Esaki (27) observando-se o padrão de pigmentação da pelagem para indivíduos da progênie F1 nascidos do acasalamento entre a linhagem teste e uma linhagem albina. No presente trabalho é apresentado o resultado do acasalamento entre as linhagens C57BL/6 e A/J do grupo 1 de animais. No anexo 3 é apresentado um modelo de teste de acasalamento entre uma linhagem albina e DBA/2.

3.6 Teste de histocompatibilidade

Grupos de 3 casais da Colônia de fundação das linhagens CBA/Han, BALB/c, C57BL/6 e A/J, entre 6 e 9 semanas de idade, oriundos das matrizes importadas, foram separados e submetidos à técnica de transplante singeneico de pele heterotrópico, orelha x dorso, conforme metodologia descrita por Hedrich (43). Para controle da técnica, todo o animal recebeu auto-enxerto. Os animais foram observados diariamente até o 7º dia e semanalmente até 150 dias, para acompanhamento da aceitação do transplante mediante detecção de alterações no padrão de cor, tamanho da pele transplantada, inchaço, presença de exudato ou manchas na superfície do tecido.

3.7 Marcadores bioquímicos

Foram utilizados animais do grupo 2, oriundos de colônias geneticamente monitoradas, do Instituto Pasteur para a obtenção das amostras para testes com marcadores bioquímicos e DNA padrão. Esta etapa foi realizada no laboratório de genética de mamíferos deste Instituto.

Representantes de ambos os sexos das diferentes linhagens apresentadas na tabela 1 e que apresentavam idades que variavam de 3 a 4 meses, foram sangrados pelo plexo orbital e sacrificados por deslocamento cervical para a retirada de sangue e baço. As amostras de sangue foram utilizadas para a análise de alguns marcadores bioquímicos, enquanto que os baços foram congelados para posterior extração do DNA.

Para o teste daquelas linhagens, foram utilizadas as metodologias mantidas em rotina no laboratório de genética de mamíferos Instituto Pasteur, para os seguintes marcadores: enzima málica (Mod-1) - cromossomo 9; glucose fosfato isomerase (Gpi-1) e hemoglobina (Hbb) - cromossomo 7.

Enzima Málica - o sangue dos animais foi coletado em anticoagulante heparina e diluído volume a volume com uma solução de NaCl 0,15M antes de ser centrifugado. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado armazenado à 4 °C até o momento de uso. As amostras de hemácias lisadas com água destilada foram aplicadas em gel de amido hidrolisado a 12%, em tampão Tris-ácido cítrico 0,63M pH 6,0. As amostras foram submetidas a eletroforese aplicando-se uma diferença de potencial de 100V por 5h à 4 °C. Após a eletroforese a atividade enzimática foi revelada através da incubação do gel com as amostras em câmara escura a 37 °C por 40 minutos, em solução de revelação (anexo 4).

Glucose Fosfato Isomerase - Para a revelação da atividade da glucose fosfato isomerase, a papa de hemácias foi diluída a 1:3 em água destilada e amostras aplicadas em fitas de acetato de celulose (Titan III) para separação eletroforética a 200V por 30 a 45 minutos com tampão fosfato-citrato 0,01M pH 7,0. A revelação da atividade da Gpi-1, foi feita com substrato enzimático descrito no anexo 5.

Hemoglobina cadeia beta - Para a reação, a cada 10 μ l de sangue, foram adicionados 150 μ l da solução de alquilação constituída de cistamina, cloreto de amônio e DTE (dithioerthriol) diluída a 1/5 (anexo 6). Aliquotas de 10 μ l das amostras diluídas foram aplicadas em tiras de acetato de celulose (Titan III) e submetidas a eletroforese em tampão Tris EDTA Borato pH 8,4, a 350V por 15 minutos à temperatura ambiente. A placa com as amostras foi incubada à temperatura ambiente com a solução de Ponceau por 20 minutos e em seguida lavada com ácido acético 5%.

3.8 Isolamento do DNA

3.8.1 Extração fenólica das amostras de DNA a partir do baço

As amostras de DNA de alto peso molecular, foram extraídas de baço de animais das linhagens padrão da Colônia de Fundação do Instituto Pasteur (grupo2), transferidos para o laboratório de genética de mamíferos, segundo a metodologia descrita por Sambrook, (82) e a sua caracterização e análise obedeceu as metodologias descritas por Love & cols. (59).

Na extração fenólica, o baço de cada animal, foi depositado em nitrogênio líquido e em seguida triturado. Ao pó fino obtido foram adicionados 4ml de solução ou tampão de lise, seguidos de 250µl da solução de proteinase K e 500µl de solução de RNase. Os tubos com as amostras de DNA receberam 4ml da solução saturada de fenol e deixados por uma noite sob agitação lenta para a primeira lavagem. No dia seguinte foram centrifugados a 3000rpm por 15 minutos e o DNA recolhido e transferido para um outro tubo. Na segunda lavagem foram utilizados 4ml de uma solução composta de fenol e clorofórmio (V/V), deixada em agitação por 2 horas e centrifugada a 3000rpm por 15 minutos. Em seguida as amostras de DNA foram transferidas para outros tubos e receberam 4ml de clorofórmio. Após um período de agitação lenta de 2 horas, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante dialisado por 48h a 4 °C com tampão Tris-EDTA. As amostras foram então avaliadas quanto a sua concentração, pureza e atividade com o uso da técnica do PCR.

Todas as soluções de uso encontram-se descritas no anexo 7.

3.8.2 Extração das amostras de DNA a partir da orelha, por precipitação alcóolica

Orelhas dos animais do grupo 3, cortadas em tamanho de aproximadamente 1cm foram colocadas em tubos de centrifugação de 2ml e adicionado 700µl de tampão de lise composto por SDS 0,5%; NaCl 0,1M; Tris-HCl 50mM e EDTA 5mM pH 8,0.

Em seguida, foram depositados 4µl de proteinase K 20mg/ml (diluída em EDTA 0,1M) e os tubos foram deixados sob agitação lenta durante a noite a 37°C. No dia seguinte, os tubos foram lavados com 700 µl de solução de

fenol saturado (anexo 7) e centrifugados a 9000rpm por 5 minutos. O DNA foi recolhido e 700µl de clorofórmio foi adicionado. Após centrifugação a 9000 rpm, o sobrenadante (DNA) foi transferido para um outro tubo no qual foram colocados 1ml de etanol absoluto. A medusa (DNA) foi então recolhida, transferida para outro tubo e deixada em sistema a vácuo por 2 horas para a evaporação do álcool. Após este período, um volume de 300µl de água foi adicionado para a diluição das amostras que foram armazenadas a 4 °C até o momento do uso.

3.8.3 Análise das Amostras de DNA

Concentração - Um volume da diluição de 1:100 de cada amostra de DNA foi retirado para a leitura da absorbância nos comprimentos de onda de 260nm e 280nm. O coeficiente de pureza foi obtido a partir do registro das densidades ópticas do DNA a 260nm e 280nm e expresso na relação 260nm/280nm.

Denaturação - A avaliação da presença de DNA de alto peso molecular, bem como de eventual denaturação ocorrida durante o processo de extração, foi realizada através de eletroforese em agarose a 0,3%, depositado sobre um gel suporte (agarose 1%). No preparo do gel suporte, de corrida e no sistema de eletroforese, foi utilizado tampão Tris - Ácido Acético glacial e EDTA pH 7,5 indicado em anexo 8. Para essa análise, 10µl de cada amostra de DNA diluída a 1/2, 1/5, 1/10 e 1/100, foram homogenizados com 5µl de uma solução composta de bromofenol blue a 0,25% e sacarose a 40% e submetidas a 50V por 2h à temperatura ambiente. Nas extremidades do gel foram aplicados padrões de peso molecular de 40Kb, 23Kb, 21Kb, 18Kb, 9Kb, 6Kb e 4Kb (fração lambda 40 da HIND III digested).

Deteção de DNases - A análise da presença de enzimas que podem degenerar o DNA e comprometer a sua estocagem, foi realizada com amostras ajustadas com tampão Tris-HCl 10mM/l; MgCl₂-10mM/l e Dithierythritol 1mM/l pH 8.0 para concentração de 5mg/ml, e incubadas a 37 °C por 2 horas. A análise foi realizada mediante eletroforese em gel de agarose 0,3%.

3.8.4 Reação de PCR

Foram adotados procedimentos distintos para a obtenção de produtos de PCR, de acordo com a procedência, dos grupos de animais.

3.8.4.1 Amostras de DNA padrão

Para as amostras provenientes do grupo 2, foram escolhidos 4 marcadores polimórficos distintos (primers), localizados nos cromossomos 1, 2, 12 e 17, indicados na tabela 3. Esses marcadores apresentam sequências de nucleotídeos definidos e produtos de amplificação com diferentes pesos moleculares, conforme indicado na tabela 4.

Tabela 3 : Primers utilizados com amostras de DNA padrão e sua localização no cromossomo

Primer N°	Locus (posição)	Cromossomo N°	Localização (cM)
24	Bcl-2	1	1
49	Il-1b	2	47
1	Igh-V	12	12
23	TNF α	17	17

Tabela 4: Sequência de nucleotídeos para os primers utilizados e peso molecular dos produtos formados

Primer N°	Sequência do Primer	Produto do PCR (bp)	Unidade de repetição
1	ACATGGTAATTTATGGGCAA CTGGATACCTGCAATAGTAGA	148	(GT) 28
23	GTTTCAGTTCTCAGGGTCCTA CAGGATTCTGTGGCAATCTGG	102	(CA) 20
24	CATTATCAATGATGTACCATG GCAGTAAATAGCTGATTCGAC	132	(CA) 23
49	CCAAGCTTCCTTGTGCAAGTA AAGCCCAAAGTCCATCAGTGG	257	(TC) 24

Igh-V : Immunoglobulin Heavy Chain Variable Region

TNF α : Tumor Necrosis Factor Alpha

Bcl-2 : B-Cell leukemia-2

IL-1b : Interleucinn 1-Beta

Foram também selecionadas para análise no laboratório de genética de mamíferos do Instituto Pasteur, algumas amostras de camundongos do grupo 1 das linhagens BALB/c e C57BL/6 importadas e mantidas no Cemib/Unicamp, com o propósito de comparar o perfil das matrizes com representantes daquela Instituição. Os primers utilizados nesta avaliação encontram-se indicados na tabela 5.

Tabela 5: Primers utilizados na monitoração genética de linhagens padrão de camundongos mantidas no Cemib/Unicamp e sua respectiva localização no cromossomo.

Marcador	Cromossomo	Localização cM	Marcador	Cromossomo	Localização cM
D3mit49	3	31,4	D6mit201	6	62.9
D16mit5	16	34.7	D5mit13	5	15.8
D17mit16	17	7.7	D5mit188	5	53.0
Igh	12	73	D11mit167	11	75.0
Igh-V	12	73	D11mit41	11	47.0
Crp	1	72	D13mit13	13	21.2
Plau	14	1	D13mit3	13	2.2
Ngfg	7	22	D18mit186	18	31.4
D17mit139	17	27.2	D7mit38	7	38.0
D17mit142	17	42.9	D7mit186	7	51.5
D2mit483	2	52.1	D12mit52	12	26.8
D2mit66	2	47.6	D12mit46	12	12.3
D6mit8	6	25.7	D8mit4	8	7.8
D16mit130	16	3.3	D16mit9	16	4.4
D13mit115	13	3.3			

3.8.4.2 Amplificação das amostras de DNA padrão

Para a realização da técnica foi utilizado um "Thermo Cycler" Wessex instrumentation LTD. Mod. PREM., para placas de 96 wells.

As amostras de DNA do grupo 2 bem como as amostras de camundongos do grupo 1 das linhagens BALB/c e C57BL/6 importadas e mantidas no Cemib/Unicamp foram diluídas em tubos de 2ml a uma concentração final de 20ng/ μ l e em seguida 5,0 μ l foram depositadas na placa de

96 wells e homogenizados com 6,9µl de uma solução contendo tampão Tris-HCl 200mM pH 8,4; 2% de Tween 20; KCl 180mM; dNTPs 4mM; primers R e F; Taq Polimerase (4,5 a 5,0 UI/µl); MgCl₂ em concentrações variáveis de 20mM a 40mM, em função do primer e 13,1µl de água. A mistura coberta com 2 gotas de óleo mineral (Nujol - Sigma) foi submetida ao programa de amplificação que constou de 40 ciclos com as seguintes etapas:

denaturação primária: 3 minutos a 94°C

denaturação cíclica: 1 minuto a 92°C

pareamento: 55°C por 1 minuto

polimerização: 72°C por 30 segundos

extensão: 72°C por 3 minutos.

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 4,0%, diluído em tampão Tris -Ácido Bórico e EDTA com a adição de 3µl de brometo de etídio. Cada placa de gel foi dimensionada para a análise simultânea de até 60 amostras. Anterior a aplicação das amostras, foram adicionados 2,5µl de bromofenol blue (10X concentrado) e em seguida submetidas a uma diferença de potencial de 100V por um período de 40 a 70 minutos à temperatura ambiente.

As soluções adotadas nesta etapa de reação estão descritas no anexo 9.

Os resultados foram registrados em filme polaroid (667 iso 3000) com o sistema MP4 Land Camera sob luz ultravioleta (transiluminador Pharmacia LKB Macro Vue), imediatamente após o término da eletroforese.

3. 9 Amostras de DNA de camundongos de Instituições Nacionais

Para as amostras provenientes do grupo 3, foram escolhidos 8 marcadores polimórficos distintos (primers), localizados nos loci Igh-V, Ngfg, Plau, Crp, Igh, D3mit49, D16mit5 e D17mit16. A localização e sequência de nucleotídeos dos primers estão indicados na tabela 6. Esses marcadores apresentam sequências de nucleotídeos definidos e produtos de amplificação com diferentes pesos moleculares para cada uma das linhagens testadas, conforme ilustrado na tabela 7.

Tabela 6: Sequência de nucleotídios dos primers utilizados

Locus	Cromossoma	Sequência (R)	Sequência (F)
Igh-V	12	TAT GGG CAA AAA GAG TTC CT	CAC CAG CTT CAC CTC ACA CT
Ngfg	7	CTC CAC ATG TGT ATG TGT ATG	ATG GAG GCC GAA GAA AGA ATC
Plau	14	TGC TGG CTA GGA ATA AAC AGA	AGG GAA TTC ATG TTC AGG ATA
Crp	1	AGA ATC TGA CTT ACC CAT GGT	GAG GGA GAA GAA TTA TGT CTG
Igh	12	TAT GAA GAT GTG GTT AAA CTG	GGT CAT ACA CAT CTG CTA ATC
D3mit49	3	CTT TTC TCG CCC CAC TTT C	TCC TTT TAG TTT TTG ATC CTC TGG
D16mit5	16	CGG GGA TCA TCC CTA AAA AC	TCC CCA ATT CCT CTT GTG TC
D17mit16	17	CCA GAA GAC AGC ATT CCA CA	GTA TGT CAG GGC TAT TTG ACA GG

Tabela 7: Localização e peso molecular (bp) dos marcadores utilizados na monitoração das linhagens isogênicas das Instituições

Locus	Cromossomo	Localização		Produto de PCR			
		(cM)		(bp)			
			CBA	C3H	C57BL/6	BALB/c	A/J
Igh-V	12	73	162	162	187	168	*
Ngfg	7	22	143	143	143	138	*
Plau	14	1	193	179	179	186	*
Crp	1	72	121	158	101	151	*
Igh	12	12	181	181	214	197	*
D3mit49	3	31	109	109	139	151	*
D16mit5	16	34	163	156	156	137	132
D17mit16	17	7	92	192	124	109	92

(*) O tamanho dos produtos de PCR para esta linhagem não estão disponíveis no data-bank. Por esta razão, os resultados foram considerados por comparação direta com o padrão.

3.9.1 Amplificação das amostras de DNA dos camundongos de Instituições Nacionais

Para a realização da amplificação das amostras de DNA foi utilizado um Termociclador Pharmacia LKB - Gene ATAQ Controller, para tubos de 0,5ml. As amostras de DNA foram diluídas a 20ng/μl. Um volume de 5μl de cada amostra foi depositado nos tubos de 0,5ml e homogenizado com 20μl da solução de reação composta de tampão Tris-HCl 1M pH8,0, MgCl₂, KCl 1M,

dNTPs 4mM, Primers R e F, Tween 20 e enzima polimerase, nas proporções indicadas no anexo 10.

A esta mistura de reação, foram adicionadas 2 gotas de óleo mineral, e os tubos colocados no termociclador e submetidos ao seguinte programa de amplificação:

denaturação primária: 2 minutos a 94°C

denaturação do ciclo: 1 minuto a 93°C

pareamento: 55°C por 1 minuto

Foram utilizados 45 ciclos e uma extensão de 5 minutos a 72°C. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose a 4% e as amostras submetidas a eletroforese por 60 minutos a 100V, com um padrão de peso molecular (øX-174 RF DNA Hae III DIGESTED - Pharmacia) depositado nas extremidades do gel.

Os resultados foram registrados em filme polaroid (667 iso 3000) com o sistema MP4 Land Camera sob luz ultravioleta (transiluminador Pharmacia LKB Macro Vue), imediatamente após o término da eletroforese.

RESULTADOS

4.1 Isolamento genético das matrizes das Colônias de Fundação

Com o objetivo de estabelecer padrões para a monitoração genética de linhagens isogênicas, comparáveis as existentes em instituições de referência internacional para o padrão genético dos animais, foram obtidas matrizes de diferentes linhagens a partir de Colônias de Fundação de fornecedores confiáveis indicadas na tabela 1. Essas matrizes foram mantidas, desde o seu recebimento, em isolamento genético dentro de isoladores utilizando como modelo de acasalamento o "self perpetuation".

O desenvolvimento das unidades isoladoras propiciou o registro de uma patente com modelo ilustrado na figura 1. Este equipamento encontra-se em uso no Centro de Bioterismo da Unicamp há pelo menos 9 anos, garantindo a manutenção de colônias de camundongos e ratos isentos de vírus.



Figura 1: Matrizes certificadas mantidas em isoladores confeccionados no Cemib/Unicamp

As matrizes, eram representadas no mínimo por 3 casais e cada casal era mantido em isolamento genético em unidades isoladoras flexíveis. Os casais originaram "famílias" que foram controladas através de mapas genéticos na área de expansão de matrizes.

A análise dos mapas genéticos, evidenciou para todas as linhagens testadas, padrões de herança poligênica de acordo com o descrito na literatura para cada um dos parâmetros observados. Estes parâmetros, são considerados em todos os casais de cada geração para as diferentes Colônias de fundação e permitem um acompanhamento dos seguintes aspectos:

1. número mínimo e máximo de neonatos
2. número de partos observado durante o período de acasalamento
3. número de crias desmamadas
4. intervalo entre o acasalamento e o primeiro parto
5. intervalo entre partos
6. número de mortos no período

A partir destes dados puderam ser avaliados os índices de produtividade e mortalidade para as diferentes linhagens e os resultados estão de acordo com o descrito na literatura.

Os resultados dos transplantes de pele orelha X dorso realizado nas linhagens, CBA, C57BL/6, BALB/c e A/J, e observados tanto na fase aguda como no período de 150 dias, não acusaram rejeição.

A evolução do autoenxerto, permitiu constatar que o procedimento técnico-cirúrgico está adequado as condições do laboratório, não tendo sido observado processos inflamatórios e rejeições.

Os testes de acasalamento entre linhagens de diferentes pelagens, como exemplificado na Tabela 8, não evidenciaram qualquer resultado que sugerisse desvio (mutação) ou contaminação genética nas linhagens mantidas. As porcentagens indicadas na coluna referente ao esperado indicam os valores encontrados na literatura para este tipo de acasalamento. Não foram detectadas diferenças significativas entre o observado e esperado.

Tabela 8: Distribuição da cor de pelagem observada nos camundongos da segunda geração (C57BL/6 x A/J) F2

COR DA PELAGEM	OBSERVADO		ESPERADO
	NÚMERO DE ANIMAIS	(%)	(%)
BRANCO	196	24,2	25
PRETO	447	55,3	56
CHOCOLATE	164	20,3	19
TOTAL	807	99,8	100

Descendentes F1 (C57BL/6 x A/J) oriundos das linhagens A/J e C57BL/6 foram acasalados entre si e o produto F2 analisado quanto ao padrão de pelagem.

4.2 Estabelecimento do banco de embriões

As fêmeas de irmãos provenientes de Colônias de Fundação de cada uma das linhagens mantidas em isoladores, foram superovuladas para a produção de embriões que foram criopreservados conforme indicado no item 3.4. Esses embriões devidamente identificados, foram mantidos a -170°C em nitrogênio líquido constituindo o banco de embriões. Dados de recuperação mostram que os embriões congelados podem ser mantidos por até 4 anos, conforme exemplificado na Tabela 9.

Tabela 9: Recuperação de embriões congelados da linhagem BALB/c.

PROCEDIMENTO	LINHAGENS	
	BALB/c	CB6 (CONTROLE)
1. N° DE EMBRIÕES CONGELADOS	9	64
2. TEMPO DE CONGELAMENTO	4 ANOS	30 DIAS
3. N° DE EMBRIÕES RECUPERADOS	9	43
% DE EMBRIÕES RECUPERADOS	100	67,18
4. N° DE EMBRIÕES IMPLANTADOS	9	34
N° DE NEONATOS	4	22
% DE NASCIMENTO	44,44	64,70

4.3 Estabelecimento do banco de DNA

4.3.1 Monitoração genética por marcadores bioquímicos

Para iniciar o estabelecimento de um banco de DNA, foram obtidos animais monitorados geneticamente, oriundos do Instituto Pasteur de Paris. Estes animais foram sacrificados e os órgãos processados para a determinação dos alelos para enzima málica (MOD-1), Hemoglobina cadeia beta (Hbb), glucose fosfato isomerase (Gpi) bem como para a extração de amostras de DNA.

Os resultados para marcadores bioquímicos apresentados na Tabela 10, indicam que os animais utilizados para o estabelecimento do padrão de DNA apresentam resposta semelhante ao indicado na literatura.

Tabela 10 - Caracterização de locus dos marcadores bioquímicos Mod-1, Gpi e Hbb dos animais utilizados para o estabelecimento de padrão de DNA

LINHAGEM	BANDA DE MIGRAÇÃO					
	MOD-1		Gpi		Hbb	
	LENTA (a)	RÁPIDA (b)	LENTA (a)	RÁPIDA (b)	DIFUSA (d)	SIMPLES (s)
DDK	+	-	+	-	-	+
C3H/He	+	-	-	+	+	-
SJL/J	+	-	+	-	-	+
DBA/1	+	-	+	-	+	-
BALB/c	+	-	+	-	+	-
C57BL/6	-	+	-	+	-	+
NZB	-	+	+	-	+	-
DBA/2	+	-	+	-	+	-
CBA	-	+	-	+	+	-
129/Sv	+	-	+	-	+	-
C57BL/6 X SJL/J*	+	+	+	+	-	+
C57BL/6 X CBA*	-	+	-	+	+	+

(*) Linhagens híbridas utilizadas como controle

4.3.2 Caracterização do DNA padrão

As amostras de DNA destes animais processadas conforme indicado em materiais e métodos, apresentaram os resultados indicados na Tabela 11.

Tabela 11 - Concentração e coeficiente de pureza das amostras de DNA padrão das diferentes linhagens de camundongos.

LINHAGEM	FENÓTIPO DA PELAGEM	D.O. (260nm)	D.O. (280nm)	coeficiente de pureza (260nm/280nm)
C57BL/6	preto	0,276	0,162	1,70
DBA/2	marrom diluído	0,256	0,130	1,96
BALB/c	albino	0,280	0,150	1,86
CBA	agouti	0,151	0,088	1,71
NZB	preto	0,225	0,132	1,70
C3H/He	agouti	0,163	0,098	1,66
DBA/1	marrom diluído	0,142	0,080	1,78
SJL/J	albino	0,198	0,110	1,80
129/Sv	agouti	0,420	0,240	1,75
DDK	albino	0,231	0,136	1,70

Estas amostras foram analisadas em gel de agarose 0,3% utilizando-se diferentes diluições (1/2, 1/5, 1/10 e 1/100), não tendo sido detectada nenhuma denaturação, mesmo em alta concentração. Na diluição de 1/100 observamos moléculas migrando em concordância com o padrão de Peso Molecular de 50Kb (Fração ... 40 da HIND III digested).

Estas amostras testadas para a presença de DNAses (conforme descrito no item 3.8.3), revelaram a ausência de contaminantes com esta enzima, e os testes feitos com os marcadores Tnfa (cromossomo 17 - 19cM); Bcl-2 (cromossomo 1 - 14cM); Il-1b (cromossomo 2 - 47cM) e Igh-V (cromossomo 12 - 73cM), mostraram resultados semelhantes aos indicados na literatura, conforme ilustrado na Tabela 12.

Tabela 12: Tamanho relativo dos produtos de PCR do DNA das linhagens de camundongo padrão utilizando-se diferentes marcadores.

MARCADOR	POLIMORFISMO DETECTADO NAS LINHAGENS PADRÃO
Igh-V	SJL/J > C57BL/6 > 129/Sv=DDK > DBA/1 > BALB/c=C3H/He > CBA=NZB > DBA/2
Tnfa	C57BL/6 > DDK > DBA/1 > SJL/J=129/Sv > C3H/He=CBA > NZB > BALB/c > DBA/2
Bcl-2	C57BL/6 > DBA/2 > 129/Sv=DDK > DBA/1=NZB=BALB/c > CBA > SJL/J=DDK > C3H/He
Il-1b	DBA/1=BALB/c > DBA/2=C57BL/6 > DDK=SJL/J=C3H/He > 129/Sv=CBA > NZB

NOTA: As linhagens estão posicionadas em ordem crescente dos produtos de PCR (peso molecular). Aquelas posicionadas à direita, apresentam um produto de PCR maior que as posicionadas à esquerda. As linhagens interligadas com o sinal de igual (=) apresentam produtos indistinguíveis eletroforéticamente, e portanto com peso molecular muito próximo.

4.3.3 Atividade em PCR das amostras padrão mantidas no Cemib/Unicamp

Amostras de DNA extraídas conforme indicado em materiais e métodos, foram analisadas no laboratório de genética de mamíferos do Instituto Pasteur de Paris. Os marcadores utilizados e indicados na tabela 5, não revelaram diferenças com os padrões.

4.4 Avaliação genética de linhagens de camundongos mantidas em algumas Instituições brasileiras

As amostras de DNA extraídas das linhagens isogênicas das diferentes Instituições, foram processadas em reação de PCR conforme indicado no item 3.9., utilizando-se como controles as amostras de DNA padrão. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose na presença de padrão de peso molecular (Figura 2).

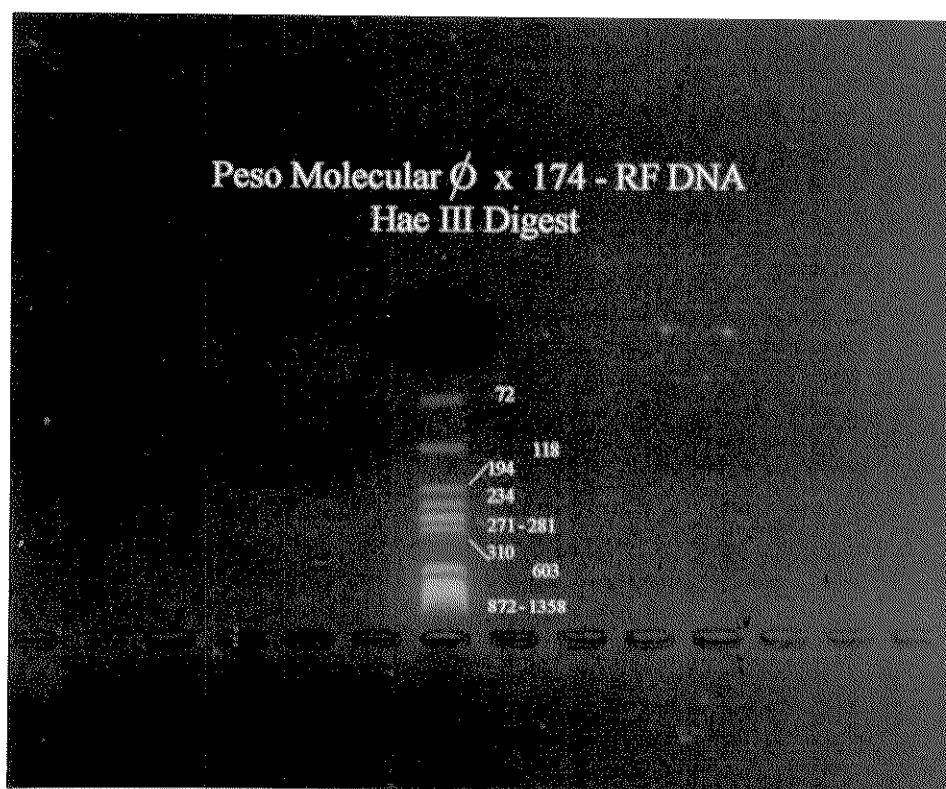


Figura 2: Eletroforese em agarose de padrão de peso molecular ϕ X 174-RF DNA Hae III Digest

Os dados referentes a linhagem CBA acham-se apresentados a seguir. Das três Instituições que nos enviaram amostras de animais de suas Colônias de Fundação para esta linhagem, duas revelaram alterações no “background genético” de CBA. Nas figuras de 3 a 9, pode-se verificar que os animais da instituição A apresentam produtos de PCR diferentes do padrão quando testados com os marcadores Igh-V (cromossomo 12 - 73cM); D16Mit5 (cromossomo 16 - 34,7cM); Crp (cromossomo 1 - 72cM); D3Mit49 (cromossomo 3 - 31,4cM); Plau (cromossomo 14 - 1cM); Igh (cromossomo 12 (73cM) e D17Mit16 (cromossomo 17 - 7,7cM).

Os resultados apresentados na figura 5, mostram que os animais da instituição B indicam para o marcador Crp (cromossomo 1 - 72cM), uma diferença bastante significativa no padrão de migração.

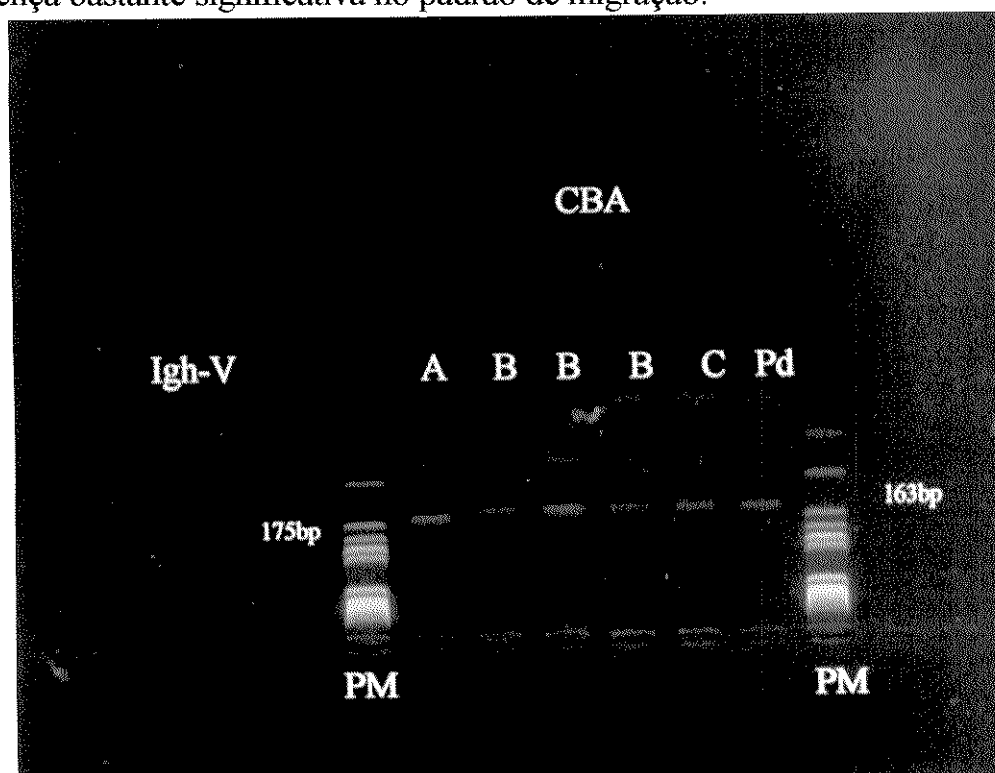


Figura 3: Eletroforese de produtos de PCR com o primer Igh-V para a linhagem CBA de camundongos das Instituições A,B e C. PM - padrão de peso molecular

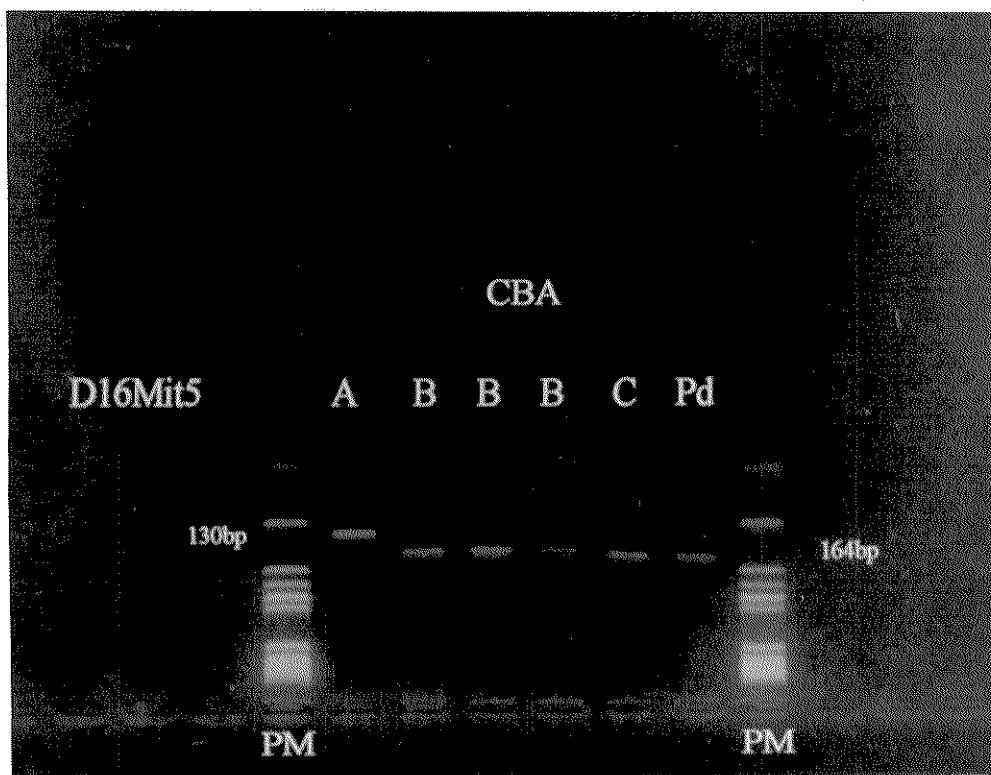


Figura 4: Eletroforese de produtos de PCR com o primer D16Mit5 para a linhagem CBA de camundongos das Instituições A,B e C. PM - padrão de peso molecular

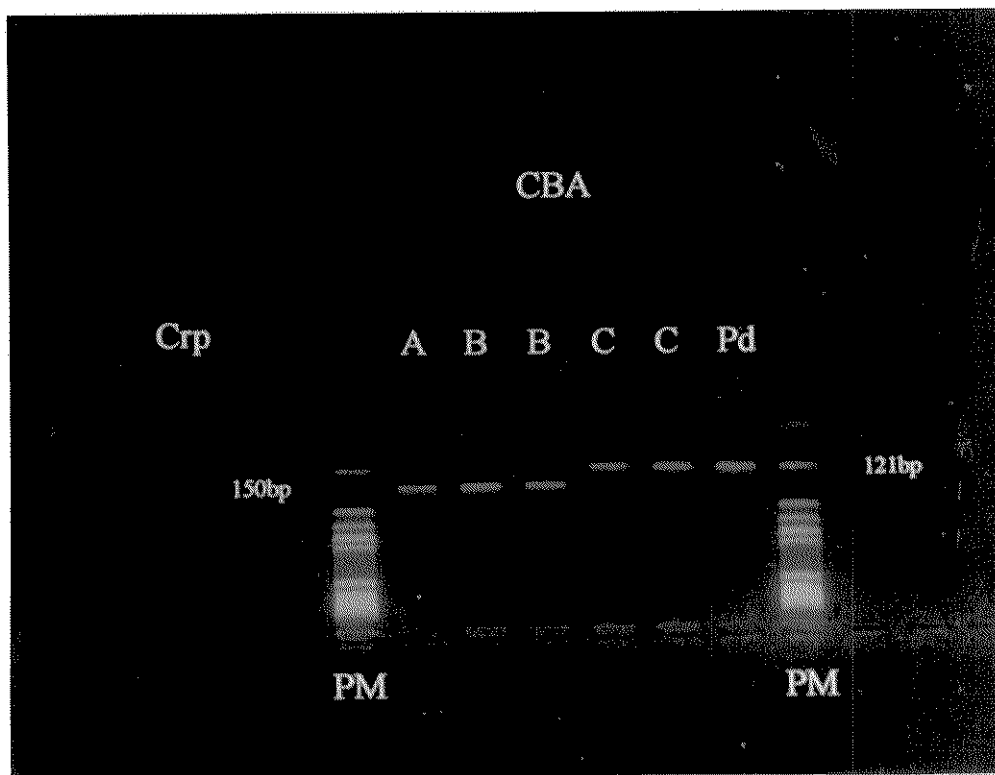


Figura 5: Eletroforese de produtos de PCR com o primer Crp para a linhagem CBA de camundongos das Instituições A,B e C. PM - padrão de peso molecular

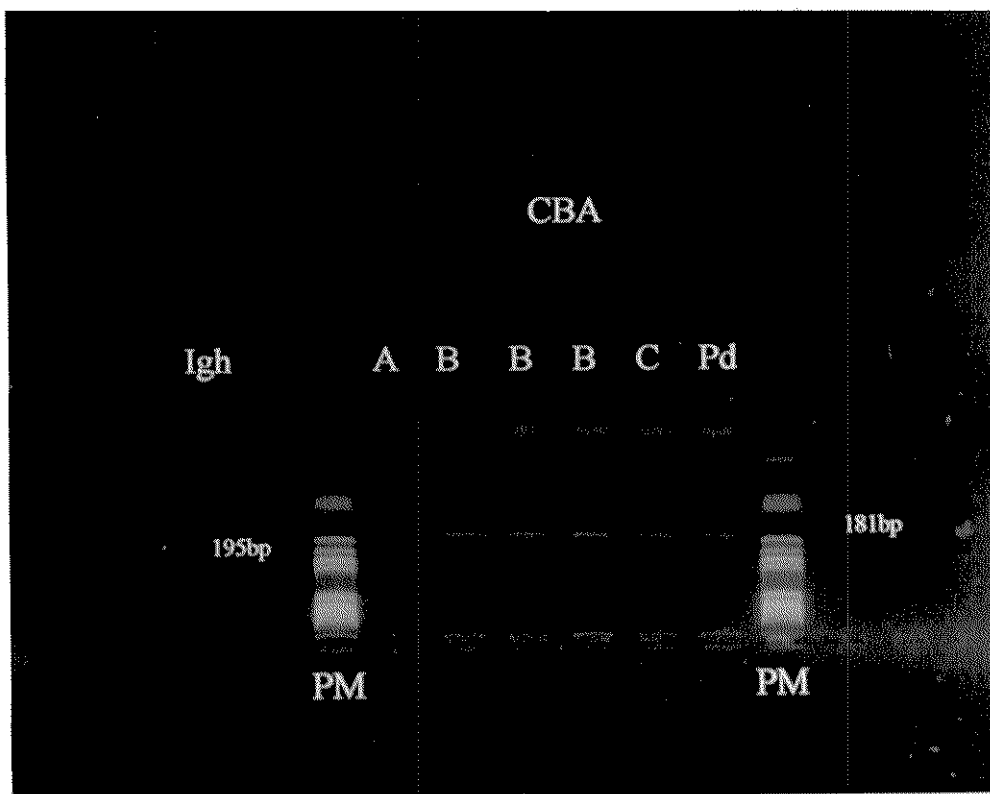


Figura 6: Eletroforese de produtos de PCR com o primer Igh para a linhagem CBA de camundongos das Instituições A,B e C. PM - padrão de peso molecular

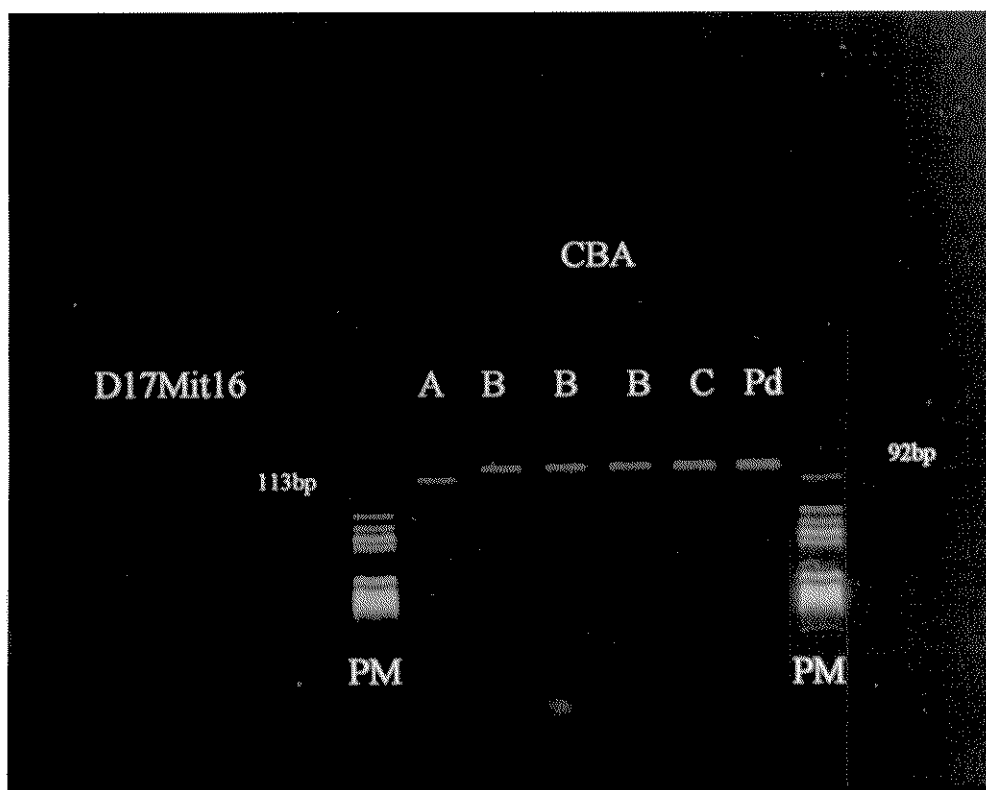


Figura 7: Eletroforese de produtos de PCR com o primer D17Mit16 para a linhagem CBA de camundongos das Instituições A,B e C. PM - padrão de peso molecular

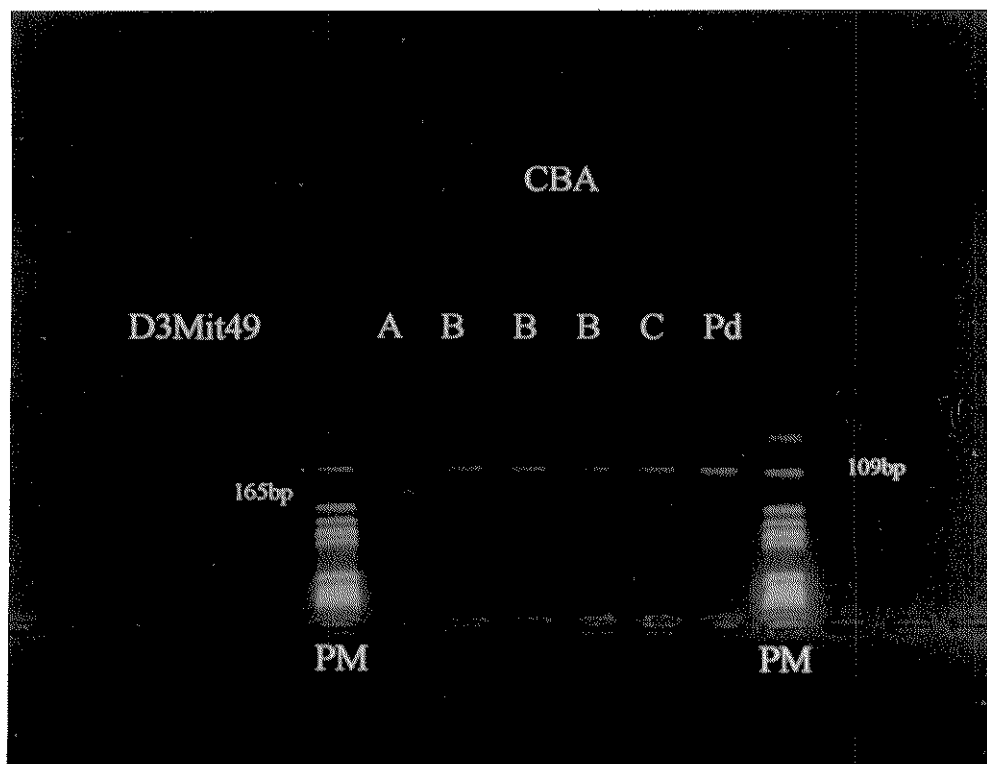


Figura 8: Eletroforese de produtos de PCR com o primer D3Mit49 para a linhagem CBA de camundongos das Instituições A,B e C. PM - padrão de peso molecular

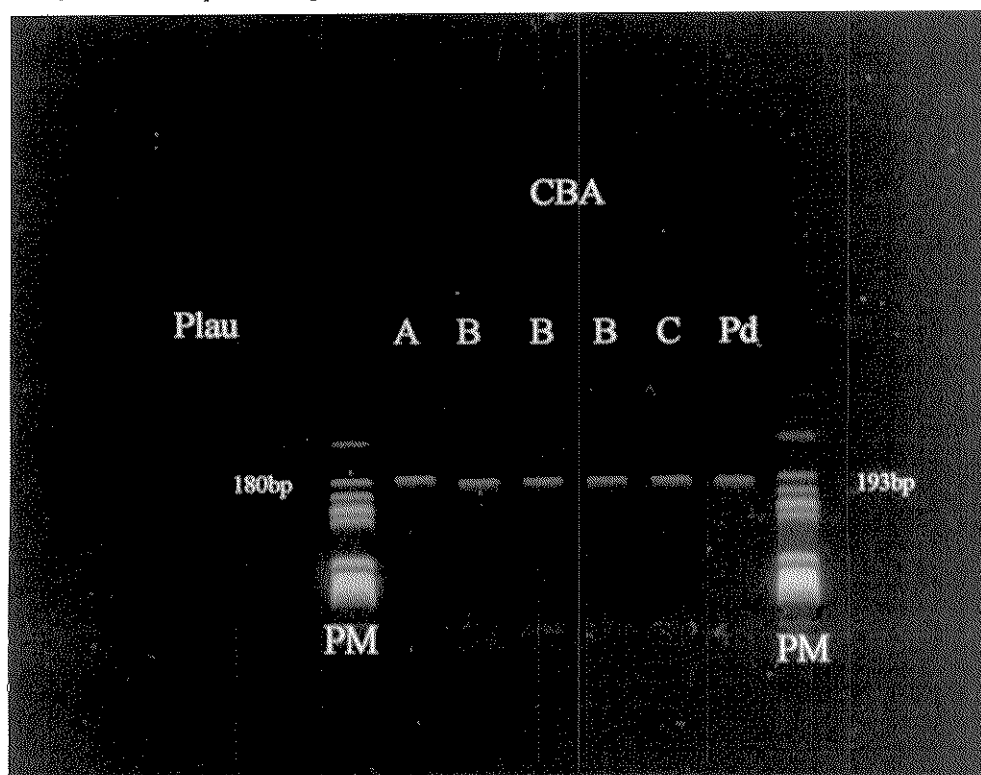


Figura 9: Eletroforese de produtos de PCR com o primer Plau para a linhagem CBA de camundongos das Instituições A,B e C. PM - padrão de peso molecular

Os dados referentes a linhagem BALB/c apresentados abaixo, mostram que a instituição D apresentou resultados diferentes do padrão para quase 50% dos marcadores.

Nos microsatélites dos loci monitorados com os marcadores D3Mit49 (cromossomo 3 - 31,4cM); D17Mit16 (cromossomo 17 - 7,7cM) e Ngfg (cromossomo 7 - 22cM), detectou-se grande diferença.

Um ensaio realizado para outros marcadores onde foram monitorados os cromossomos 06 na posição de 62,9cM e cromossomo 12 na posição de 26,8cM, mostrou uma resposta bastante diferente do padrão. No cromossomo 7 a 38cM do centrômero também foi detectado um produto de PCR diferente do DNA padrão.

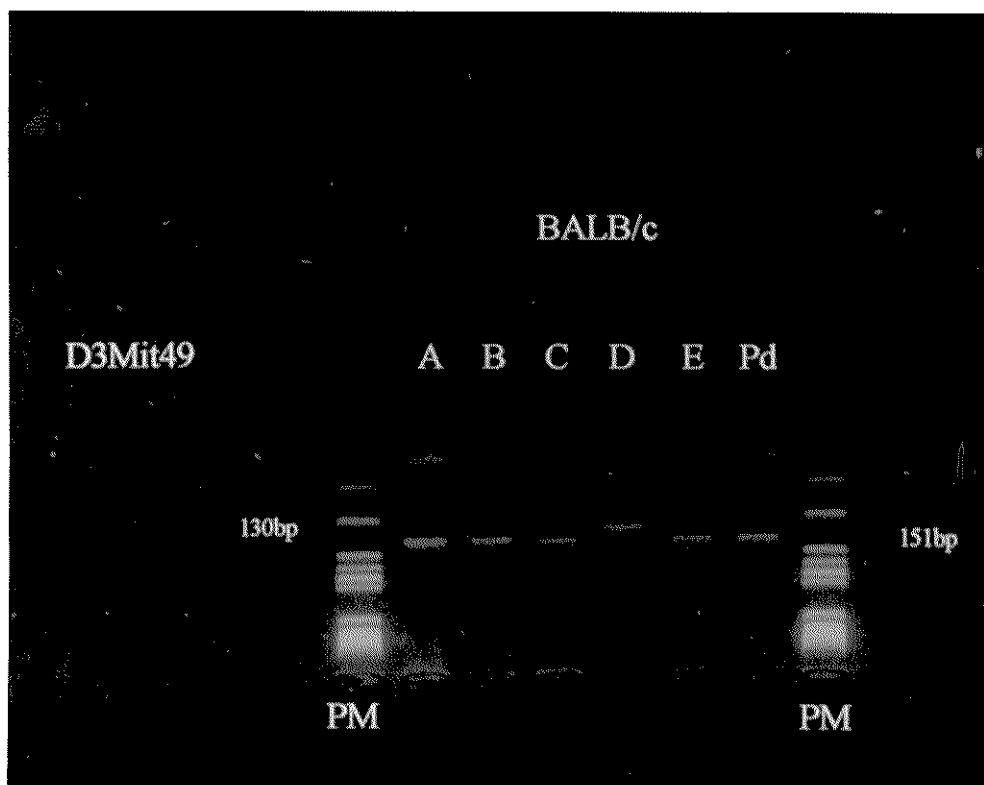


Figura 10: Eletroforese de produtos de PCR com o primer D3Mit49 para a linhagem BALB/c de camundongos das Instituições A,B, C, D e E. PM - padrão de peso molecular

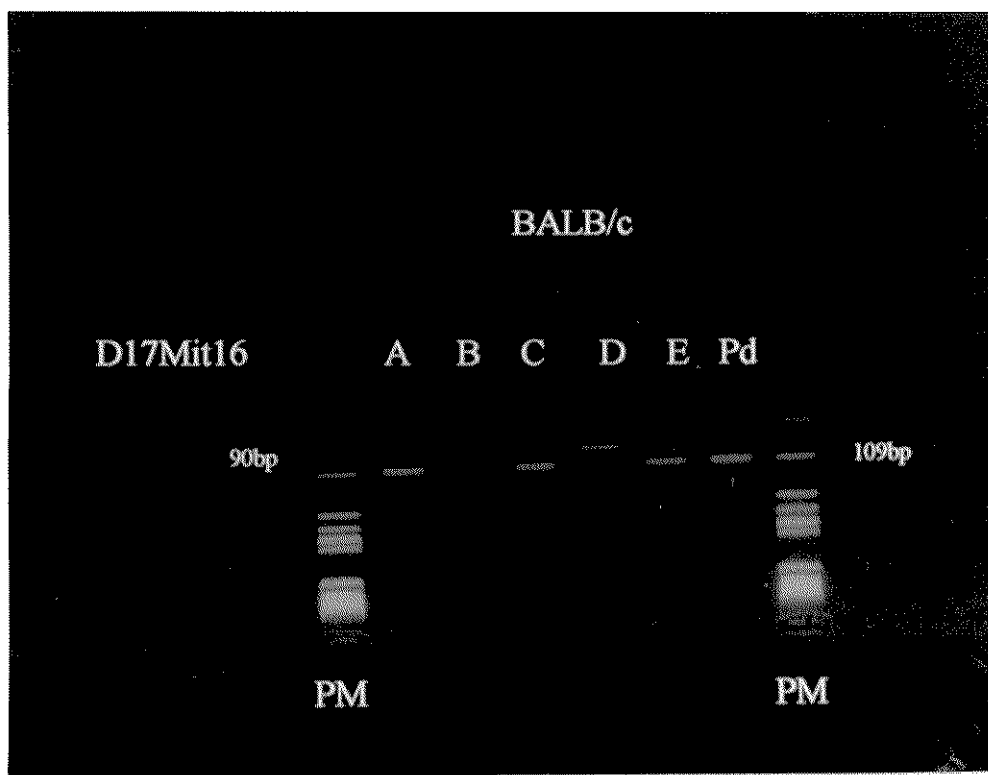


Figura 11: Eletroforese de produtos de PCR com o primer D17Mit16 para a linhagem BALB/c de camundongos das Instituições A,B ,C, D e E. PM - padrão de peso molecular

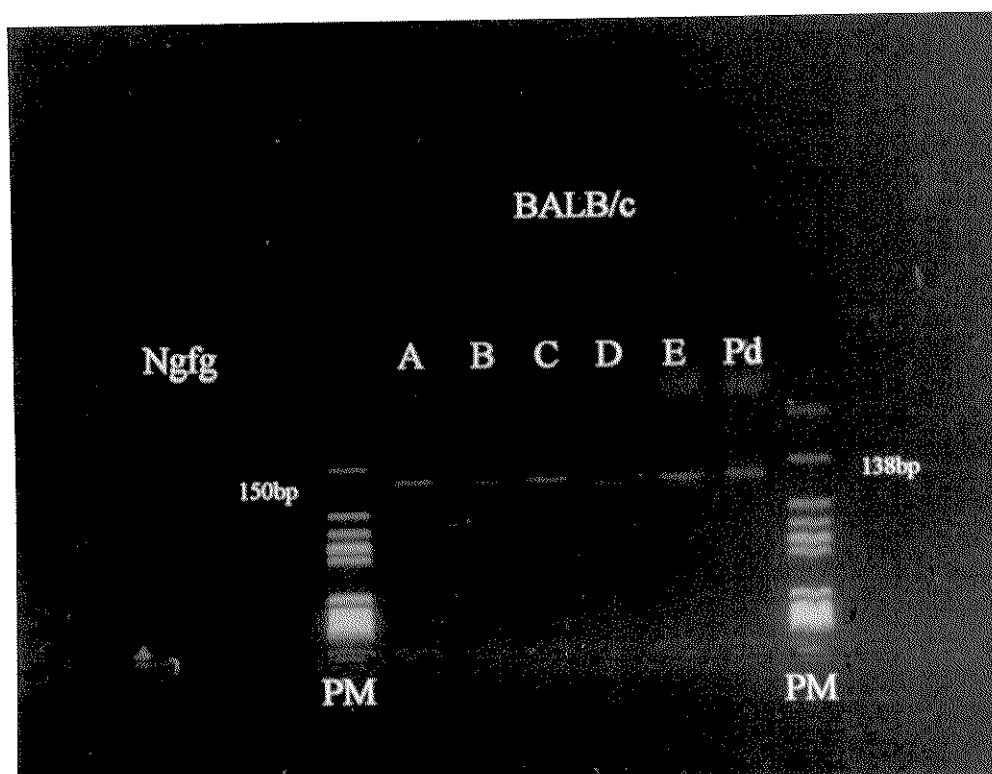


Figura 12: Eletroforese de produtos de PCR com o primer Ngfg para a linhagem BALB/c de camundongos das Instituições A,B ,C, D e E. PM - padrão de peso molecular

Os animais das linhagens A/J, C3H/He e C57BL/6 tiveram suas amostras testadas e os dados obtidos não apresentaram diferença significativa quando comparados com as amostras padrão.

Estudos sobre a filogenia dos camundongos iniciados na década de 40, permitem o reconhecimento de 11 subespécies do *Mus musculus*, baseados em aspectos morfológicos (91). Contudo, Bonhomme & cols. (12) baseados na análise por marcadores bioquímicos de 42 loci, consideram que existem apenas 5 grupos com 4 grandes subespécies : *Mus musculus domesticus*, *Mus musculus bactrianus*, *Mus musculus castaneus*, *Mus musculus musculus*, *Mus musculus molossinus* (89). A subespécie de origem asiática (*molossinus*) não pode ser definitivamente separada da *bactrianus*, razão pela qual aceita-se a existência de 4 grandes subespécies. Essas 4 subespécies iniciaram a sua derivação, há cerca de 1 milhão de anos, e em razão de seu afastamento geográfico podem ser encontradas: no oeste europeu - *domesticus*, no Japão - *molossinus*; no leste europeu, Rússia e norte da China - *musculus* e no oeste e sudoeste da Ásia e no sul da China - *castaneus*. Da subespécie *domesticus* derivou, há cerca de 2000 anos, o camundongo “fancy” (*) europeu, enquanto o “fancy” do leste asiático derivou da subespécie *molossinus* hibridizada com a *musculus*, *molossinus* hibridizada com a *castaneus* ou diretamente da *musculus* (89). Recolhidos em cativeiro, representantes desses camundongos “fancy” constituem-se hoje nos mais próximos ancestrais (aproximadamente 200 anos) dos camundongos utilizados na pesquisa biomédica (91).

A capacidade dos camundongos produzirem descendentes férteis e viáveis de acasalamentos interespecíficos, permite o estudo de polimorfismos com segregações muito variadas. Como consequência, estes animais têm a vantagem de ter o mais detalhado mapa genético entre todos os mamíferos (41). Entretanto o estabelecimento da identidade genética de uma linhagem mesmo já caracterizada, é uma tarefa altamente complexa. O camundongo é dotado de 19 cromossomos

* Camundongos utilizados em demonstrações histriônicas em feiras ambulantes

autossômicos e dois cromossomos sexuais; podemos observar através de seu mapa genético que a despeito de esforços de importantes Centros de pesquisa, apenas uma parte (cerca de 1800) de seus 2500 genes identificados, está mapeada (42). Admitindo-se que cada gene contenha apenas um par de alelos, seria teóricamente necessário testar cada um dos produtos dos 5000 genes para atestar a real identidade genética. Em vista da impossibilidade prática de fazê-lo, a identidade genética do animal se apoia sobretudo em procedimentos operacionais padronizados para controle da qualidade, e, cuja execução só se torna possível em Centros onde existe infraestrutura adequada associada a uma equipe com treinamento especializado (11, 21).

O primeiro procedimento padronizado refere-se à obtenção de matrizes oriundas o mais próximo possível da Colônia de Fundação da linhagem original (94). As linhagens isogênicas são produtos de laboratório obtidas em instituições especializadas (Jackson, ZFV, Institut Pasteur, Charles Rivers, etc.) e disseminadas para outros centros que passam a atuar como repositórios. A manutenção destas linhagens em qualquer Instituição corre o risco de apresentar contaminação ou deriva genética (mutação). Para diminuir os riscos de contaminação, as matrizes devem ser mantidas em sistemas fechados, isolados de outras linhagens isogênicas ou heterogênicas e ao abrigo de contaminação com roedores silvestres que atraídos pelo odor da ração podem vir através de esgotos, dutos de ar ou mesmo calhas de iluminação. A melhor maneira de isolamento é sem dúvida a manutenção das matrizes em isoladores, sistema adotado nos grandes Centros de produção.

A inexistência no país de empresas produtoras de unidades isoladoras flexíveis e as dificuldades de importação destes equipamentos no início deste programa, estimulou a sua construção com tecnologia e matéria prima

nacionais, motivando uma solicitação de patente (n° 8.906.330-9). O equipamento desenvolvido apresentou um excelente desempenho e viabilizou o isolamento genético necessário ao estabelecimento dos padrões procedentes da importação de matrizes certificadas, bem como a implantação de importante etapa dos procedimentos operacionais padronizados (71). A tecnologia foi transferida para outras Instituições que passaram a utilizá-lo em suas áreas de matrizes.

Para diminuir os riscos de deriva genética, são utilizadas 3 metodologias: a criopreservação de embriões, sistema de acasalamento com registro de mapas genéticos, e a monitoração periódica de alguns dos genes que permitem distinguir as linhagens.

A tecnologia de manipulação de embriões, é essencial a Centros que se propõem a fornecer matrizes certificadas geneticamente, uma vez que devem estar disponíveis através de um banco de embriões, representantes das diferentes linhagens das Colônias de Fundação, que possam ser resgatados a qualquer momento, permitindo a perpetuação da identidade original das linhagens isogênicas (47, 48, 102, 104).

Atualmente podem ser utilizadas diferentes metodologias para rotina de congelamento, descongelamento e cultivo de embriões murinos em diferentes estágios de desenvolvimento. Deve-se fazer a opção pelos procedimentos de coleta e implante de embriões, que mais se adaptem às condições do Centro Produtor.

No presente trabalho utilizamos a transferência e implante de embriões de 2 e 8 células provenientes de indivíduos da Colônia de Fundação certificada, que foram submetidos a uma estimulação hormonal exógena (superovulação). Os dados apresentados mostram que o processo de criopreservação funciona adequadamente, o que permite manter embriões das

matrizes da primeira geração recebida, por pelo menos 4 anos, conforme pode ser observado tanto com resultados obtidos com os animais do grupo principal da linhagem BALB/c da Colônia de fundação, como através do grupo de animais híbridos da linhagem CB6, utilizados como controle dos procedimentos de descongelamento e implante. Não foram detectados aspectos morfológicos indicativos de perda da viabilidade (integridade da zona pelúcida, tamanho dos blastômeros, etc.), ainda que, segundo a literatura, a viabilidade de embriões transferidos depende mais da extensão da gestação, que de outros fatores (62). Embriões parcialmente destruídos, podem apresentar crescimento em meio de cultivo, embora não consigam por si só manter a função lútea necessária à manutenção da prenhez (36).

Embora os resultados obtidos estejam de acordo com o descrito na literatura, a eficiência do processo poderá ser melhorada. É bem conhecido a capacidade de fatores como volume de meio inoculado, número de embriões transferidos por oviduto, etc, interferirem no sucesso do implante (84, 45). Boubelick & Cerna descrevem uma modificação no procedimento de congelamento em 2 etapas em um banco no qual são mantidos mais de 17000 embriões de várias linhagens, com uma porcentagem de sobrevida pós descongelamento de 85% em média e sucesso com 20% a 35% de nascimentos (15). Além disso, o estabelecimento de rotinas de congelamento, descongelamento e transferência de embriões deve considerar aspectos relacionados ao crioprotetor utilizado (103), influência do genótipo e outros fatores (3, 84, 85, 104, 106).

Para a linhagem BALB/c foram descritos índices de 49% de ovócitos não fertilizados (77) e 80 a 85% de sucesso no congelamento de embriões de 4 a 8 células com o método de congelamento em duas etapas. Nossos resultados

mostram estarmos próximos destes valores em ambos os grupos, possibilitando a preservação dos padrões para controles futuros.

A segunda etapa do acompanhamento genético das matrizes importadas e mantidas em unidades isoladoras tem como base os marcadores morfológicos. Estes são subdivididos em duas partes, sendo a primeira a observação cuidadosa dos animais durante os procedimentos de rotina. O sucesso desta primeira parte depende portanto da capacidade dos técnicos observarem mudanças na cor da pelagem, anormalidades externas, distúrbios neurológicos, aumento da produtividade ou do peso, etc. (90). Portanto é essencial ressaltarmos a importância dos programas de treinamento da equipe. Paralelamente deve-se adotar métodos reprodutivos como o “self perpetuation”. Este método é definido através da substituição a cada 5 gerações, das famílias originais de cada unidade isoladora, por descendentes geneticamente monitorados. Desta forma, uma possível deriva genética (mutação) dificilmente permanecerá na colônia de fundação. Por outro lado, os registros em mapas genéticos de heranças poligênicas como cor de pelagem, prolificidade, produtividade, etc, através das quais o perfil genético das linhagens pode ser acompanhado a cada geração, não apenas possibilita um acompanhamento próximo das matrizes mas principalmente permite compará-los com os dados observados para as diferentes linhagens em outros Centros, aspecto indispensável a padronização. Por conseguinte, métodos reprodutivos como o “Self Perpetuation”, controle fenotípico através de mapas genéticos de linhagens acasaladas, monitoração de alelos através de diferentes metodologias e a adoção da criopreservação (banco de embriões), são aspectos indispensáveis à manutenção do padrão genético original (96, 33, 102).

Embora a manutenção das linhagens em isoladores, associada ao sistema de acasalamento e mapa genético, sejam indispensáveis a preservação do

padrão genético original, para que as colônias sejam certificadas, são necessários métodos como testes de acasalamento para análise dos genes de pigmentação; antígenos de histocompatibilidade; marcadores bioquímicos e DNA cromossômico; capazes de demonstrar que determinados genes não foram alterados.

Os testes de acasalamento para genes de pigmentação se baseiam na frequência da distribuição dos fenótipos entre indivíduos F1 e F2. Este teste é também recomendado na detecção de deriva genética, uma vez que é frequente a associação entre mudanças no padrão de pigmentação e mutação (27, 44). Entretanto, deve-se observar dois aspectos importantes: a necessidade de várias semanas até que a progênie F1 alcance a idade na qual toda a expressão dos genes relacionados ao fenótipo da cor de pelagem, tenha se manifestado, e, o sacrifício dos animais F1 logo após o período de observação, uma vez que existe a possibilidade de um retro acasalamento com a mãe, servindo de fonte para uma contaminação (27). Os resultados indicados na tabela 8 que foram obtidos com a análise do fenótipo de pelagem de 807 animais de segunda geração (C57BL/6 X A/J), não apresentam diferenças significativas entre frequências observadas e esperadas.

A importância da análise de genes presentes no complexo principal de histocompatibilidade foi melhor compreendida, a partir das observações de Snell e Medawar acerca da imunogenética dos transplantes. Desde então, este método passou a ser frequentemente empregado na monitoração genética de camundongos de laboratório (44).

Existem centenas de loci de histocompatibilidade reconhecidos. Entre eles o mais importante, é o locus H-2 presente no cromossomo 17 dos camundongos, responsável pelo fenômeno de rejeição intensa, quando as

diferenças a seu nível são acentuadas (43). Outros vários, referidos como loci menores de histocompatibilidade, embora estejam distribuídos em diversos cromossomos, ainda não estão muito bem caracterizados (23). Esta técnica econômica e simples constitui-se em importante ferramenta para avaliar a conservação da homozigose em linhagens isogênicas estabelecidas (44). Contudo apresenta a desvantagem de requerer um tempo relativamente longo para o acompanhamento dos animais transplantados. Disparidades em loci menores de histocompatibilidade podem necessitar um período de observação de até 200 dias (44). Os resultados obtidos no presente trabalho revelaram a inexistência de rejeição agudas observadas até o 7º dia, bem como no prazo de 150 dias. O autoenxerto utilizado como controle da técnica permite concluir que a técnica encontra-se satisfatoriamente implantada. A inexistência de alterações no padrão de cor, no tamanho da pele transplantada, de inchaço ou de manchas entre os indivíduos doadores e receptores, atestam a relação de isogenicidade. É importante destacar que este método, ainda que seja rotineiro nos principais Centros produtores de animais de laboratório em países desenvolvidos, ainda encontra-se incipiente como rotina de monitoração genética no Centros nacionais.

Os avanços na bioquímica permitiram o desenvolvimento de metodologias capazes de distinguir produtos de expressão de diferentes genes. A identificação genética pode ser entendida como a comparação do perfil genético de um padrão com uma amostra desconhecida que deve ser confrontada com um ou mais marcadores genéticos identificados (46, 67, 68, 78). Entre as várias metodologias disponíveis para a identificação dos alelos, destaca-se a eletroforese em diferentes meios suportes como gel de acrilamida, amido hidrolisado de batata, acetato de celulose, etc, os quais permitem uma separação das proteínas em função de sua carga elétrica e de seu peso molecular (39, 68, 86).

Até pouco tempo, este era o principal suporte para a investigação de aspectos genéticos em nível molecular. Através destes marcadores, pode-se estudar fenômenos genéticos como a variabilidade genética em populações naturais, hibridização, relações filogenéticas e controle de linhagens de laboratório (68). Diferentes proteínas que exibem polimorfismo genético detectável por provas bioquímicas e imunológicas, podem ser utilizadas na monitoração genética: isoenzimas, proteínas como "major urinary protein" (Mup), hemoglobina (Hbb), transferina (Trf), proteínas dos soro como complemento hemolítico, etc., aloantígenos associados à membrana celular como, eritrócitos, timócitos, alótipos de imunoglobulinas, etc. (50, 64, 67, 101).

No presente trabalho, com o propósito de obtermos padrões de DNA, os animais ao serem sacrificados foram avaliados com 3 marcadores bioquímicos, conforme descrito no item 3.7. Este procedimento teve na verdade, um caráter técnico-metodológico, uma vez que os animais eram oriundos de colônias de fundação de Instituições que mantinham rotinas de controle genético. Conforme era esperado, todos os alelos estavam de acordo com a literatura para os marcadores utilizados (tabela 10), endossando a qualidade de seu genoma como fonte de DNA padrão.

Os métodos citados anteriormente, se baseiam na análise de produtos da expressão de alguns genes e por conseguinte apresentam uma limitação numérica importante na caracterização das linhagens.

Com a evolução da biologia molecular, tornou-se possível a utilização da tecnologia de manipulação de DNA na monitoração genética de linhagens. Esta tecnologia permite um acesso direto às moléculas da hereditariedade, abrindo a perspectiva de se poder comparar todo o genoma entre dois indivíduos (98, 100).

O mapa genético do camundongo apresenta um comprimento haplóide total de 1600 centiMorgans, o que corresponde a 10.000Kb. Portanto, a determinação da sequência de bases do genoma com o propósito apenas de monitoração genética, teria pouco sentido.

Duas abordagens principais têm sido utilizadas para avaliar alterações em grandes trechos deste genoma: “DNA Finger Printing” e a amplificação de determinadas regiões da molécula de DNA (81, 99).

O “Finger Printing” apresenta algumas dificuldades em sua utilização como técnica para monitoração genética, sendo as principais: a necessidade de elevadas concentrações de DNA de alto peso molecular, o uso de grande número de enzimas de restrição; e a necessidade na maioria das vezes de utilização de técnicas complementares como Southern Blotting, Western Blotting, etc. para discriminar os diferentes fragmentos (56, 93).

A amplificação de determinadas regiões foi altamente facilitada com a técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction). A partir dos trabalhos de Love & cols. no princípio da década de 90 com a análise do polimorfismo de 50 microsátélites amplificados por esta técnica, observou-se ser esta metodologia e esta região da molécula de DNA, importantes instrumentos para a construção de mapas genéticos de camundongos e humano (10, 55, 61, 87). Atualmente existem importantes variações desta metodologia, possibilitando não apenas estudos com mapas genéticos, mas também análises bastante específicas como por exemplo a do genoma de sarcomas interespecíficos (26), ou fenômenos associados a autoimunidade principalmente aqueles nos quais existe uma reatividade contra moléculas de DNA (2).

Os microssátélites podem ser definidos como regiões da molécula de DNA, presentes em todos os genes, nas quais não se observam grandes

variações nas sequências de bases. O elevado grau de polimorfismo entre as linhagens isogênicas presentes nestas regiões, permite que a mesma seja utilizada em rotinas de monitoração (59).

Os dados apresentados na tabela 11, mostram que os procedimentos de extração adotados para os animais do grupo 2, estavam adequados, com um índice de pureza superior a 1,7 para todas as amostras e inexistência de denaturação decorrente tanto da metodologia adotada como da presença de enzimas DNases, conforme foi observado por eletroforese em agarose a 0,3%. Por outro lado, conforme pode ser observado no resultado do teste apresentado na tabela 12, a existência de atividade utilizando-se a técnica de PCR com as de moléculas de DNA extraídas, permite que as mesmas sejam utilizadas como padrões para avaliação de linhagens de diferentes instituições. Além deste aspecto, podemos observar na tabela 5, o uso de um elevado número de marcadores na avaliação de amostras de matrizes certificadas mantidas no Cemib/Unicamp. Os resultados mostram que os procedimentos operacionais instalados estão adequados, uma vez que não foram detectadas diferenças com as amostras utilizadas como padrão, oriundas das colônias do Instituto Pasteur, quando da análise de várias regiões do genoma.

A análise das amostras de animais do grupo 3 oriundos de Instituições nacionais que mantém programas de pesquisa em imunologia, revela alterações no genoma de 2 linhagens mantidas em suas Colônias de Fundação, quando comparada com o padrão para os primers Igh-V, D16Mit5, Crp, D3Mit49, Plau, Igh,D17Mit16 e Ngfg. (figuras 3 - 12).

No caso da linhagem CBA, as alterações foram detectadas com 7 dos 8 marcadores testados e uma vez que não se observou heterozigose com qualquer dos marcadores, os dados sugerem uma contaminação antiga. No caso da

linhagem BALB/c, foram observados resultados diferentes do padrão, para 3 dos 8 marcadores utilizados. A ausência de heterozigose, sugere também uma contaminação estabelecida há muito tempo. A inexistência de alterações com os marcadores, Igh, Igh-V, Crp, Plau e D16Mit5, sugere que a contaminação pode ser com uma linhagem não polimórfica com BALB/c para estes primers. Um teste de possíveis alterações em outros cromossomos, realizado apenas nesta linhagem, mostrou que a mesma está contaminada, uma vez que ela diferiu do padrão ao nível dos cromossomos 6 e 12 nas posições de 62cM e 26cM respectivamente.

Embora estes achados sejam de extrema gravidade, não podemos considerá-los prerrogativa apenas de Instituições brasileiras. Hoffman & cols. realizaram no princípio dos anos 80, um estudo em colônias de camundongos de diferentes linhagens mantidas no Japão e constataram que, das 77 colônias investigadas cerca de 30% (21 colônias) estavam contaminadas (48). Mesmo empresas privadas não estão livres deste risco, conforme relato de Kahan & cols. sobre uma contaminação genética em animais BALB/c (52).

Entretanto, o atraso tecnológico observado nos países do terceiro mundo, decorrente de uma Ciência de Animais de Experimentação pouco desenvolvida, conduz a uma grave dissociação entre a realidade genética das colônias mantidas nas diversas instituições, as metodologias de monitoração genética utilizadas nas análises das colônias e os sistemas de manutenção das colônias de fundação e de expansão de matrizes, de onde derivarão as unidades de produção. Como consequência, além do aspecto de não se poder realizar os mesmos ensaios de Centros de Pesquisa de países desenvolvidos, perde-se também o caráter da reprodutibilidade experimental. Desta forma, a pouca atenção dirigida aos aspectos genéticos de linhagens mantidas em Instituições brasileiras e utilizadas em ensaios imunológicos, certamente conduzirá a um grave “isolamento

científico”. A existência de variações genéticas pode interferir seriamente na exatidão dos resultados dificultando sua interpretação e até mesmo tornando-o absolutamente inadequado. Como consequência, observamos um comprometimento do delineamento experimental agravado em perda de tempo e recursos investidos (31).

Para que as áreas da pesquisa biomédica que utilizam modelos animais tais como a Imunologia, Farmacologia, Fisiologia, etc., sejam efetivadas do ponto de vista científico, é essencial que os resultados obtidos, possam ser comparados e avaliados em laboratórios diferentes. Isto somente é possível mediante a padronização e uniformidade genética (32).

Nas últimas décadas, um largo espectro de linhagens "geneticamente definidas" tais como linhagens isogênicas, congênicas, recombinantes, etc., tornaram-se disponíveis para a pesquisa biomédica, que conta atualmente com mais de 1000 linhagens de camundongos e ratos, cada qual representando uma importante ferramenta para o pesquisador, sendo bem conhecida a necessidade de seu controle (32,44, 81). Como exemplo, podemos citar estudos nos quais a base genética de reação a drogas explicita a importância da caracterização genética das linhagens (34).

Em decorrência disto, pesquisadores envolvidos com programas para o estabelecimento de uma Ciência e Tecnologia de Animais de Experimentação concentraram esforços para que os animais fossem padronizados do ponto de vista genético, assegurando que suas características permanecessem estáveis por muitas gerações (34). Apesar destes esforços, diversos autores relatam a existência de linhagens isogênicas de camundongos com “background” genético diferente do esperado, ressaltando as consequências destas diferenças em diversas áreas da pesquisa dependente de modelos animais (31, 40, 60).

Outro aspecto importante é o pequeno número de programas a nível Nacional, para a formação de especialistas na área. Como consequência, mudanças no “background” genético passam a ser consideradas, apenas quando alterações fenotípicas tais como cor de pelagem, peso, produtividade, etc., tornam-se evidentes. Por conseguinte, fatores relativamente comuns como migração, falhas de acasalamento ou mesmo a existência de heterozigose residual, que são responsáveis pela perda da identidade da linhagem, passam despercebidos.

O conjunto de dados apresentados no presente trabalho mostra que o Cemib/Unicamp pode manter matrizes de Colônias de Fundação em isolamento genético, criopreservar embriões de um grande número de linhagens normais ou mutantes importantes para a imunologia, manter um banco de DNA onde estão armazenados padrões de diferentes linhagens e realizar a monitoração genética utilizando diferentes métodos entre os quais a análise de microsatélites por PCR, que se mostrou de elevada sensibilidade e de extrema praticidade, podendo ser utilizado sem o sacrifício do animal.

Desta forma, a comunidade científica pode receber animais que, geneticamente eram disponíveis apenas em Centros de Pesquisa de países desenvolvidos. Outro benefício decorrente da definição do perfil genético das linhagens de camundongos adotadas na pesquisa é assegurar a validação de experimentos principalmente onde são abordados os mecanismos envolvidos no controle genético das doenças de interesse humano.

RESUMO E CONCLUSÕES

Importantes pesquisadores mostraram nas décadas de 30 e 40, que a constituição genética dos animais de experimentação, é fundamental para o estudo da resposta imune. Por esta razão, o uso de camundongos de mesma linhagem mantidos em diferentes laboratórios deve permitir a obtenção de resultados universais e que possam ser reproduzidos. Isto é possível apenas com linhagens padronizadas e monitoradas geneticamente, de forma que alterações no genoma provenientes de contaminação ou mutações, possam ser detectadas.

A inexistência de linhagens certificadas e padronizadas do ponto de vista genético no país, exigiu o estabelecimento de novas colônias e de condições para a monitoração das linhagens utilizadas na pesquisa biomédica em geral e particularmente em imunologia. Para atingir este objetivo realizamos o presente trabalho que visou implantar a partir de linhagens certificadas:

Colônias de Fundação mantidas com procedimentos operacionais padronizados;

Banco de embriões para perpetuação das características originais;

Banco de DNA para programas de monitoração genética.

A partir da consolidação destas metodologias e utilizando a técnica de PCR na amplificação de microsátélites polimórficos presentes em moléculas de DNA de alto peso molecular, foi realizada uma análise do perfil genético para as linhagens de camundongos CBA, BALB/c, C57BL/6, C3H/He e A/J, oriundas de cinco instituições que mantêm programas de pesquisa na área de imunologia.

Os resultados obtidos com os primers Crp, Igh-V, D3Mit49, D17Mit16, Igh, Ngfg, Plau e D16Mit5, mostram que as linhagens CBA das instituições A e B e BALB/c da instituição D, apresentaram resultados diferentes dos animais oriundos do Instituto Pasteur utilizados como padrão.

Os dados atestam a não identidade genética para algumas das linhagens testadas e apontam para a necessidade de um levantamento nacional associado ao estabelecimento de programas de monitoramento periódico em colônias de biotérios brasileiros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H. & POBER, J.S. 1994. The major histocompatibility complex. *Celular and molecular immunology*. W.B. Saunders company. p. 96-114.
- 2- ALARCON-RIQUELME, M.E. & FERNANDEZ, C. 1995. CDR3 regions in the preimmune V-HB cell repertoire of lpr mice. **Clin. Exp. Immunol.** v. 101, n.1, p. 73 - 77.
- 3- ANASTASSIADIS, K. & ROTTMANN, O. 1994. Embryo transfer in mouse: Influence of genotype and other factors **Archiv fuer Tierzucht** v. 37, n.4, p. 461 - 469.
- 4- AZOULAY, A., BRAHIC, M. & BUREAU, J.F. 1994. FVB Mice transgenic for the H-2D gene become resistant to persistent infection by Theiler's Virus. **J. Virol.** p. 4049 - 4052.
- 5- BACH, J.F. 1982. Introdução a imunogenética humana. *Imunologia*. Guanabara Koogan ed. p. 341 - 350.
- 6- BABINET, C., MORELO, D. & RENAR, J.P. 1989. Transgenic mice. **Genome.** v. 31, p. 938 - 949.
- 7- BAILEY, D.W. 1971. Recombinant inbred strains. **Transplantation.** v. 11 n.3, p. 325 -327.
- 8- BANCROFT, G.J., SCHREIBER, R.D., BOSMA, G.C., BOSMA, M.J. & UNANUE, E.R. 1987. A T cell-independent mechanism of macrophage activation by interferon- γ . **J. Immunol.** v. 139, p. 1104-1107.
- 9- BEALL, J.R., TORNING, F.E. & RUNKLE, R.S. 1971. A laminar flow system for animal maintenance. **Lab. Anim. Scien.** v. 21, p. 206 - 212.
- 10- BECKMAN, J.S. 1992. Rat gene mapping using PCR - analyzed microsatellites. **Genetics** v. 131, p. 701 - 721.

- 11- BLEBY, J. 1986. The training of laboratory animal specialists. In: Regional/International scientific meeting. Laboratory animal science: Laboratory animal studies in the quest of health and knowledge. Águas de Lindóia. **Proceedings**. Ribeirão Preto, ICLAS, CEMIB, FESBE, Sociedade Brasileira de Genética. p. 86 - 93.
- 12- BONHOMME, F., CATALAN, J., BRITTON-DAVIDIAN, J., CHAPMAN, V.M., MORIWAKI, K., NEVO, E. & THALER, L. 1984. **Biochem. Genet.** v. 22, p. 275-303.
- 13- BOSMA, M.J. & CAROLL, A.M. 1991. The Scid Mouse Mutant: Definition, Characterization, and Potential Uses. **Ann. Rev. Immunol.** v.9, p. 323 - 350.
- 14- BOX, P.G. 1976. Criteria for producing high quality animals for research. **Lab. Anim. Scien.** v. 26 n.2 pt. II, p. 334 - 338.
- 15- BUBELIK, M. & CERNA, Z. 1993. A modified two-step method for cryopreservation of mouse embryos for purposes of embryo banking. **F. Biol. (Prague)** v. 39, n. 4, p. 211 - 219.
- 16- BUREAU, J.F., BIHL, F., BRAHIC, M. & PASLIER, D.L.E. 1995. The gene coding for interferon- is linked to the D12S335 and D12S313 microsatellites and to the MDM2 gene. **Genomics** v. 28, p. 109 - 112.
- 17- BUREAU, J.F., MONTAGUTELLI, X., BIHL, F., LEFEBVRE, S., GUÉNET, J.J. & BRAHIC, M. 1993. Mapping loci influencing the persistence of Theiler's virus in the murine central nervous system. **Nat. Gen.** v. 5, p. 87 - 91.
- 18- BUREAU, J.F., MONTAGUTELLI, X., LEFEVRE, S., GUÉNET, J.L., PLA, M. & BRAHIC, M. 1992. The interaction of two groups of murine genes determines the persistence of theiler's virus in the central nervous system. **J. Virol.** v. 66, p. 4698 - 4704.

- 19- CASEBOLT, D.B., LINDSEY, J.R. & CASSELL, G. 1988. Prevalence rates of infectious agents among commercial breeding populations of rats and mice. **Lab. Anim. Sci.** v. 38, p.327-329.
- 20- CLOUGH, G. & GAMBLE, M.R. 1976. Laboratory animal houses. a guide to the design and planning of animal facilities. **LAC Manual Series m.4**, Carshalton, Surrey, MRC/LAC. p. 44.
- 21- COHEN, B.J. & RINGLER, D.H. 1987. Training in laboratory animal medicine for the 1990s. **IN: Regional/International Scientific Meeting. Laboratory animal science: Laboratory animal studies in the quest of health and knowledge.** Águas de Lindóia. **Proceedings.** Ribeirão Preto, ICLAS, CEMIB, FESBE, Sociedade Brasileira de Genética. p. 79 - 85.
- 22- CROY, B.A. 1993. The application of *Scid* mouse technology to questions in reproductive biology. **Lab. An. Sci.** v.43, p. 123-126.
- 23- DEMANT, P. 1980. Histocompatibility genes and their use in genetic control of laboratory mice. **IN: A. Spiegel, S. Erichsen and a sollereid (eds). Animal quality and models in biomedical research.** Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. p. 298 - 306.
- 24- DILLEHAY, D.L., LEHNER, N.D.M. & HUERKAMP, M.J. 1990. The effectiveness of a microisolator cage system and sentinel mice for controlling and detecting MHV and Senday virus infections. **Lab. Anim. Scien.** v. 40, p. 367 - 370.
- 25- DUBEY, D.P., MIRZA, N.M., ZAHARIAN, B.I. & YUNIS, E.J. 1993. Role of a Genetic Region on Chromosome 4 in the regulation of natural Killer Cell Activity in Mice. **Europ. J. Immunogen.** v. 20 p. 381 - 389.
- 26- DUDLEY, M.E., SUNDBERG, J.P. & ROOPENIAN, D.C. 1995. Motif-primed polymerase chain reaction-based allelotype of sarcomas induced by 3-methylcholanthrene in interspecific hybrid mice. **Oncogene** v. 11, p. 517 - 524.

- 27- ESAKI, K. 1984. Qualitative characters in genetic monitoring **IN**: ICLAS manual for genetic monitoring of inbred mice. Edited by: Tatsuyi Nomura, Kozabuno Esaki, Takeshi Tomita. University of Tokyo Press.
- 28- EVERITT, J.I., ROSS, P.W. & DAVIS, T.W. 1988. Urologic Syndrome Associated with Wire Caging in AKR Mice. **Lab. Anim. Scien.** v. 38, p. 609 - 611.
- 29- FERNANDEZ, J.L. & WEEKS, M. 1986. Genetic monitoring of inbred strains of mice using monoclonal antibodies to major histocompatibility haplotypes and lymphocyte antigens. **Lab. Anim. Scien.** v. 20, p. 293 - 297.
- 30- FERNANDEZ, J.L. & WEEKS, M. 1988. Genetic monitoring of rat strains using monoclonal antibodies specific for polymorphic class I and class II MHC antigens. **Lab. Anim. Scien.** v. 22, p. 235 - 239.
- 31- FESTING, M.F.W. 1982. Genetic contamination of laboratory animal colonies: an increasingly serious problem. **Ilar News** . v. 25, p. 6 - 10.
- 32- FESTING, M.F.W. 1979. Inbred strains in biomedical research. Mac Millan Press. New York.
- 33- FESTING, M.F.W. 1987. Introduction to laboratory animal genetics. **IN**: The UFAW Handbook on the use & management of laboratory animals. Edited by Trevor B. Poole sixth edition. Longman Scientific & Technical, England. p. 59 - 84.
- 34- FESTING, M.F.W. & EYDMANN, T. 1986. The development of an *in-vitro* method for studying genetic variation in response to xenobiotics in mice. **IN**: Regional/International Scientific Meeting. Laboratory animal science: Laboratory animal studies in the quest of health and knowledge. Águas de Lindóia. **Proceedings**. Ribeirão Preto, ICLAS, CEMIB, FESBE, Sociedade Brasileira de Genética. p. 79 - 85.
- 35- FITTE, L., AUBERT, C., MULLER, U., HUANG, S., AGUET, M., BRAHIC, M. & BUREAU, J.F. 1995. Theiler's virus infection of 129Sv mice that lack the interferon or interferon receptors. **J. Exp. Med.** v. 81, p. 2069 - 2076.

- 36- FUKU, E., FISCHER, P.S., MARCUS, G.J., SASADA, H. & DOWNEY, B.R. 1993. Development of whole and demi-embryos of mice in culture and in vivo after supercooled storage. **Cryobiology** v. 30, p. 604 - 608.
- 37- GILIOLI, R. SAKURADA, J.K., ANDRADE, L.A.G., KRAFT, V., MEYER, B., & RANGEL, H.A. 1996. Virus infection in rat and mouse colonies reared in Brazilian Animal facilities. **Lab. Anim. Scien.** v. 46, p. 63 - 65.
- 38- GODFRAIND, C., HOLMES, K.V. & COUTELIER, J.P. 1995. Thymus involution induced by mouse hepatitis virus A-59 in BALB/c mice. **J. Virol.** v.69, p. 6541-6547.
- 39- GROEN, A. 1977. Identification and genetic monitoring of mouse inbred strains using biochemical polymorphisms. **Lab. Anim.** v. 11, p. 209 - 214.
- 40- GUBBELS, E., POORT-KEESON, R. & HILGERS, J. 1985. Genetically contaminated BALB/c nude mice. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** v. 122, p. 86 - 88.
- 41- GUÉNET, J.L. 1995. Animal models of human genetic disease. **IN: Gene Target.** edited by Manuel A. Vega. p. 149 - 166.
- 42- GUÉNET, J.L. 1991. La cartographie des gènes chez la souris. **Annales de L'Institut Pasteur** v.3, p. 205 - 227.
- 43- HEDRICH, H.J. 1992. Genetic monitoring of inbred strains of rats. Gustav Fischer Verlag. New York.
- 44- HEDRICH, H.J. 1983. Overview of the state of the art in genetic monitoring. **IN: Melby E.C. and Balk. M.W (ed): The importance of laboratory animal genetics, health, and the environment in biomedical research.** Academic Press inc. (London).
- 45- HEDRICH, H.J. & REETZ, I.C. 1988. Strain preservation of rodent embryos. Possibilities and limitations. **In: Beynen AC, Solleveld HA (Eds.) New developments in biosciences: their implications for laboratory animal science.** Martinus Nijhoff Dordrecht Press. p. 163 -173.

- 46- HILGERS, J., DEIMLING, O. VON., ZUTPHEN, L.F.M. VAN., BERG, R. TEN., ANAND, R. & FESTING, M.F.W. 1988. Esterase alleles of inbred mouse strains maintained in The Netherlands **Gen. Res.** v. 51, p. 29 - 40.
- 47- HILL, A.C. & STALLEY, G.P. 1991. *Mycoplasma pulmonis* infection with regard to embryo freezing and hysterectomy derivations. **Lab. Anim. Scien.** v. 41 n. 6, p. 563 - 565.
- 48- HOFFMAN, H.A., SMITH, K.T., CRONELL, J.S. NOMURA, T. & TOMITA, T. 1980. **IN:** Animal quality and models in biomedic research. A. Spiegel, S. Erichsen and H.A. Solleveld. (eds). G. Fisher, Stuttgart. p. 307 - 317.
- 49- HOGAN, B., COSTANTINI, F. & LACY, E. 1986. Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory pp. 322.
- 50- HUDSON, D.M., FINLAYSON, J.S. & POTTER, M. 1967. Linkage of one component of the major urinary protein complex of mice to the brown coat color locus. **Gen. Res.** v. 10, p. 195 - 198.
- 51- JONAS, A.M. 1976. The research animal and the significance of a health monitoring program. **Lab. Anim. Scien.** v. 26 n.2 pt. II, p. 339 - 344.
- 52- KAHAN, B., AVERBACH, R., ALTER, B.J., et al. 1982. Histocompatibility and isoenzyme differences in commercially supplied "BALB/c" mice. **Science.** v. 217, p. 379 - 381.
- 53- KLEIN, J. 1982. The experimental animal. Immunology the science of self-nonsel discrimination. Wiley-Interscience Publication. John Wiley & Sons.
- 54- KNUDSEN, D.E.B. & WAGNER, J.E. 1987. The Wire-Bar Cage Top as a to Breeding and Genetic Contamination of Laboratory Mice. **Lab. Anim. Scien.** v. 37, p. 350 - 351.

- 55- KONDO, Y., MORI, M., KURAMOTO, T., YAMADA, J., BECKMANN, J.S., CHAZZOTTES, D.S., MONTAGUTELLI, X., GUÉNET, J.L. & SERIKAWA, T. 1993. DNA segments mapped by reciprocal use of microsatellite primers between mouse and rat. **Mamm. Genom.** v. 4, p. 571 - 576.
- 56- KUNIEDA, T., NOMURA, N., ISHIZAKI, R., ARAKI, K., TOYODA, Y. & IMAMICHI, T. 1993. Identification of inbred rat strains by using DNA finger printing method. **Lab. Anim. Scien.** v. 43, p. 603 - 606.
- 57- La REGINA, M., WOODS, L., KLENDER, P., GAERTNER, T.J. & PATURZO, F. 1992. Transmission of Sialodacryoadenitis virus (SDAV) from infected rats to rats and mice through handling close contact, and soiled bedding. **Lab. Anim. Sci.** v. 42, p. 344-347.
- 58- LAPIDOT, T., PFLUMIO, F. & DICK, J.E. 1993. Modeling human hematopoiesis in immunodeficient mice. **Lab. Anim. Scien.** v. 43, p.147-150.
- 59- LOVE, M.J., KNIGHT, A.M., McALEER, M.A. & TODD, J.A., 1990. Towards construction of a high resolution map of the mouse genome using PCR - analysed microsatellites. **Nucl. Ac. Res.** v. 18, p. 4123 - 4130.
- 60- LOVELL, D.P., TOTMAN, P.B. & BIGELOW, S.W. 1984. An investigation of genetic variation within a series of congenic strains of mice. **Lab. Anim.** v.18, p.291 - 297.
- 61- McCARTHY, L., HUNTER, K., SCHALKWYK, L., RIBA, L., ANSON, S., MOTT, R., NEWLL, W., BRULEY, C., BAR, I., RAMU, E., HOUSMAN, D., COX, R. & LEHRACH, H. 1995. Efficient high-resolution genetic mapping of mouse interspersed repetitive sequence PCR products, toward integrated genetic and phisical mapping of the mouse genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 92, p. 5302 - 5306.

- 62- MCLAREN, A. 1970. The fate of very small litters produced by transfer in mice. **J. Endocr** v.47, p. 87 - 94.
- 63- MEDAWAR, P.B. 1958. The immunology of transplantation. **Harvey Lect.** v. 52, p.144-176.
- 64- MENENDEZ, R.C. 1985. Animales de laboratorio en las investigaciones biomedicas. Cuba, La Habana Editorial. Ciencias Medicas. p. 203.
- 65- MOREL, L., YU, Y., BLENMAN, K.R., CALDWELL, R.A. & WAKELAND, E.K. 1996. Production of congenic mouse strains carrying genomic intervals containing SLE-susceptibility's genes derived from the SLE - prone NZM2410 strain. **Mamm. Genom.** v. 7, p. 335 - 339.
- 66- MOULIA, C., Le BRUN, N. & RENAULD, F. 1996. Mouse-parasite interactions: from gene population. **Adv. Parasitol.** v. 38, p. 119-167.
- 67- MOUTIER, R. 1971. Biochemical differences as a means of genetic control for inbred strains of laboratory animals. **IN: Defining the Laboratory Animal.** Nation. Acad. Scien. Washington, D.C. p. 169 - 178.
- 68- MURPHY, R.W., SITES, J.W., BUTH, D.G. & HAUFLER, C.H. 1990. Proteins I: Isozyme electrophoresis. **IN: Molecular Systematics.** Hillis, D.M. and C. Moritz(eds). Sinauer Assoc., Inc. Sunderland, Massachussetts, USA. p. 45-126.
- 69- PAKES, S.P., LU, Y-S. & MEUNIER, P.C. 1984. Factors that complicate animal research. **IN: Laboratory Animal Medicine.** Fox J.G.,Cohen B.J., Loew F.M. (eds.) Academic Press, New York, NY. p. 649-665.
- 70- PARASCANDOLA, J., B. 1994. The History of Animal Use in the Life Sciences **IN: The world congress on alternatives and animal use in the life sciences: education, research, testing.** Alan M. Goldberg and LFM Von Zutphen (Eds.). Mary Ann Liebert, Inc. publishers.
- 71- PASSOS, L.A.C. & ALVES, D.P. 1996. Isoladores. **IN Manual para Técnicos em Bioterismo.** De Luca, R.R., Alexandre, S.R., Marques, T., Souza, N.L., Merusse, J.L.B. e Neves, S.P. (eds). Segunda ed. São Paulo. p. 27 - 34.

- 72- PATON, W. 1984. Man and mouse. Animals in medical reseach. Oxford University Press. Oxford.
- 73- PAVAN, W.J., MAC, S., CHENG, M. & TILGHMAN, S.M. 1995. Quantitative trait loci that modify the severity of spotting in piebald mice. **Genom. Res.** v.5, p.29-41.
- 74- POPE, M., CHUNG, S.W., MOSMANN, T., LEIBOWITZ, J.L., GORCZYNSKI, R.M. & LEVY, G.A. 1996. Resistance of naive mice to murine hepatitis virus strain 3 requires development of a Th1, but not Th2, response, whereas pre-existing antibody partially protects against primary infection. **J. Immunol.** v.156, p. 3342 - 3349.
- 75- PUEL, A., GROOT, P.C., LATHROP, M.G., DEMANT, P. & MOUTON, D. 1995. Mapping of genes controlling quantitative antibody production in Biozzi mice. **J.Immunol.** v. 154, p. 1799 - 5805.
- 76- RANGEL, H.A., VERINAUD, L., CAMARGO, I.J.B., GILIOLI, R. & SAKURADA, J.K. 1994. Murine virus contaminant of *Trypanosoma cruzi* experimental infection. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** v.36, p. 423 - 431.
- 77- REETZ, I.C., SCHMIDT, M.W., KRAFT, V. & HEDRICH, H.J. 1988. Rederivation of inbred strains of mice by means of embryo transfer. **Lab. Anim. Scien.** v. 38, p. 696 - 701.
- 78- RICHARDSON, B.J. 1986. Other biological uses for allozyme electrophoresis. **IN:** Allozyme electrophoresis. B.J. Richardson, P.R. Baverstock and M. Adam (eds) Academic Press Inc. San Diego California.
- 79- ROTHSHIELD, M.A. 1990. Manual para técnicos de bioterismo. São Paulo, Epm, Finep. p. 220.

- 80- ROWLAND, R.R.R., BUTZ, E.A. & PLAGEMANN, P.G.W. 1994. Nitric oxide production by splenic macrophages is not responsible for T cell suppression during acute infection with lactate dehydrogenase-elevating virus. **J. Immunol.** v. 152, p. 5785 - 5795.
- 81- RUSSEL, R.J., FESTING, M.F.W., DEENY, A.A. & PETERS, A.G. 1993. DNA fingerprinting for genetic monitoring of inbred laboratory rats and mice. **Lab. Anim. Scien.** v. 43, p. 460 - 465.
- 82- SAMBROOK, J., FRITSH, E.F. & MANIATIS, T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 83- SARON, M.F., SHIDANI, B., NAHORI, M.A., GUILLON, J.C. & TRUFFA-BACHI, P. 1990. Lymphocytic choriomeningitis virus-induced immunodepression: inherent defect of B and T lymphocytes. **J. Virol.** v. 64, p. 4076 - 4080.
- 84- SCHMIDT, P.M., HANSEN, C.T. & WILDT, D.E. 1985. Viability of frozen-thawed mouse embryos is affected by genotype. **Biol. Reprod.** v. 32 p. 507 - 514.
- 85- SCHMIDT, P.M., SCHIENE, M.C. & WILDT, D.E. 1987. The genotypic response of mouse embryos to multiple freezing variables. **Biol. Reprod.** v. 37, p. 1121 - 1128.
- 86- SEFERIAN, P.G. & RODKEY, L.S. 1994. Identification of laboratory animals by using affinity immunoblotting. **Lab. Anim. Scien.** v. 44, p. 85 - 87.
- 87- SERIKAWA, T., KURAMOTO, T., HILBERT, P., MORI, M., YAMADA, J., DUBAY, C.J., LINDPAINTER, K., GANTEN, D., GUÉNET, J.L., LATHROP, G.M., & BECKMAN, J.S. 1982. Rat gene mapping using PCR-analyzed microsatellites **Genetics** v.131, p. 701 - 721.
- 88- SERRANO, L.J. 1971. Carbon dioxide and ammonia in mouse cages. Effect of cage covers, population and activity. **Lab. Anim. Scien.** v. 21, p. 75 - 85.

- 89- SHIROISHI, T., & YONEKAWA, H. 1994. Genetic differentiation and geographical distribution of various subspecies of mice **IN: Genetics in wild mice - It's applications to biomedical research.** Edited by - Kozuo Moriwaki. Japan Scientific Societies Press.
- 90- SHULTZ, L.D. 1991. Immunological mutants of the mouse. **The Amer. J. Anat.** v. 191, p. 303 - 311.
- 91- SILVER, L.M. 1995. Mouse Genetics concepts and applications. Oxford University Press, England. 1 - 362
- 92- SIROVÁ, M., RIHOVÁ, B., RIHA, I. & LEIPNER, C. 1993. IL-2 and IL-3 production in high and low IgG-responding strains of mice. **Immunol. Letters** v. 37, p. 91 - 96.
- 93- SOUTHERN, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis **J. Mol. Biol.** v. 98, p. 503 - 517.
- 94- STAATS, J. 1980. Standardized nomenclature for inbred strains of mice seventh listing. **Cancer Res.** v. 409, p. 2083 - 2128.
- 95- TAVERNE, J. 1994. Transgenic mice and the study of cytokine function in infection. **Parasitol. Today** v. 10, p. 258 - 262.
- 96- TREXLER, P.C. 1987. Animals of defined microbiological status. **IN: The UFAW handbook on the care & management of laboratory animals.** Edited by Trevor Poole sixth ed. Longman Scientific & Technical , England. p. 85 - 98.
- 97- VERINAUD, L.M.C. 1996. Alteração na resposta imune em infecção experimental de *Trypanosoma cruzi* induzida pela contaminação com corona virus murino. Tese de doutorado apresentada ao Instituto de Biologia da Unicamp. p. 71.

- 98- WELCH, J., RAMPINO, N., McCLELLAND, M. & PERUCHO, M. 1995. Nucleic acid fingerprinting by PCR-based methods: Applications to problems in aging and mutagenesis. **Mutat. Res.** v. 338, p. 215 - 229.
- 99- WELLS, R., GREEN, P. & REEDERS, S.T. 1989. Simultaneous genetic mapping of multiple human minisatellite sequences using DNA fingerprinting. **Genomics** v. 5, p. 761 - 772.
- 100- WELSH, J., PETERSEN C. & McCLELLAND M. 1991. Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the mouse: application to strain identification and genetic mapping. **Nucl. Ac. Res.** v. 19, p. 303 - 306.
- 101- WHITNEY, J.B. 1978. Simplified Typing of Mouse Hemoglobin (Hbb) Phenotypes Using Cystamine . **Biochem. Gen.** v. 16, p. 7 - 8 .
- 102- WHITTINGHAM, D.G. 1974. Embryo banks in the future of developmental genetics. **Genetics** v.78, p. 395 - 402.
- 103- WHITTINGHAM, D.G. 1981. Sensitivity of mouse embryos to the rate of thawing. **IN:** Zeilmaker G.H. (ed.), *Frozen Storage of Laboratory Animals*. Stuttgart. Gustav Fisher p. 21 - 32.
- 104- WHITTINGHAM, D.G., LYON, M.F. & GLENISTER, P.H. 1977. Re-establishment of breeding stocks of mutant and inbred strains of mice from embryos stored at - 196°C for prolonged periods. **J. Reprod. Fertil** v. 30, p. 287 - 299.
- 105- WILLIAMS, S.S., ALOSCO, T.R., CROY, B.A. & BANKERT, R.B. 1993. The study of human neoplastic disease in severe combined immunodeficient mice. **Lab. An. Sci.** v. 43, p. 139 - 146.
- 106- WILMUT, I. 1972. The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. **Life Sci** v. 11, p. 1071 - 1079.

- 107- WRIGHTSMAN, R., KRASSNER, S. & WATSON, J. 1982. Genetic Control of Responses to *Trypanosoma cruzi* in Mice: Multiple Genes Influencing Parasitemia and Survival. **Infec. and Imm.** v. 36, p. 637 - 644.
- 108-YEGASHY, B.Y., NIELSEN, P., SING, A., GALANOS, C. & FREUDENBERG, M.A. 1995. Interferon γ , a cofactor in the Interferon production induced by gram-negative bacteria in mice. **J.Exp.Med** v. 18, p. 953 - 960.
- 109-YEUNG, R.S.M., PENNINGER, J & MAK, T.W. 1993. Genetically modified animals and immunodeficiency. v.5, p. 585 - 594.
- 110-ZINSER, H. 1936. Rats, Lice and History. Little Brown and Company ed. Boston

ANEXO 1

Meios de Congelamento e Descongelo dos Embriões.

Soluções estoque.

Piruvato de sódio - 85 mg são dissolvidos em 10 ml de NaCl 0,154M. A solução é distribuída em alíquotas de 1 ml e conservada em freezer.

No momento de uso 1 ml desta solução é diluído em 50ml de NaCl 0,154M.

Penicilina G - 0,127g (100000 U/ml) dissolvidos em 20ml de NaCl 0,154M. A solução é conservada em freezer em alíquotas de 1ml.

Streptomicina - 50 mg dissolvidos de 10 ml de NaCl 0,154M e conservado congelado em alíquotas de 1 ml.

Vermelho de fenol em NaHCO₃ - 13 mg dissolvidos em 10ml de NaCO₃, 0,154M.

Lactato de sódio - solução de 0,154M em água destilada. Preparada, a fresco.

Cloreto de sódio - 500 ml de uma solução de 0,154M.

Cloreto de potássio - 50ml de uma solução 0,154M

Fosfato de potássio - 50ml de uma solução 0,154M

Cloreto de magnésio - 50ml de um solução 0,154M

Fosfato de sódio - 100ml de uma solução 0,154M

Cloreto de Cálcio - 50ml de uma solução 0,110Mml.

Sulfato de Magnésio - 50ml de uma solução 0,154M.

Bicarbonato de Sódio - 50ml de uma solução 0,154M

ANEXO 1

Banco de Embriões

Meios de Descongelamento e Congelamento de Embriões - Os meios de coleta, congelamento e descongelamento de embriões foram confeccionados em fluxo laminar a partir das soluções estoque indicadas abaixo. Em seguida foram esterilizados por filtração em membrana milipore, separados em lotes e registrados com um número de partida.

Soluções estoque e volumes utilizados no preparo do meio PB1

Solução estoque	Volume
água destilada	2,08 ml
NaCl 0,154M	65,54 ml
KCl 0,154M	1,77 ml
piruvato de sódio	21,54 ml
KH ₂ PO ₄ 0,154M	0,92 ml
MgCl ₂ 0,154M	0,31 ml
Na ₂ HPO ₄ 0,154M	5,23 ml
CaCl ₂ 0,110M	0,85 ml
fenol vermelho	0,77 ml
penicilina G	1,00 ml
streptomicina	1,00 ml
Glucose	100,00 mg
BSA	300,00 mg

Obs: O pH do meio foi de 7,3 com uma osmolaridade de 310mOsmol/L. O meio foi então filtrado e estocado a 4°C. O meio de congelamento foi obtido com a adição do crioprotetor (1,2 propanodiol) para uma concentração final de 1,5M.

ANEXO 2

Solução Anestésica

A solução anestésica, Avertin é preparada a fresco a partir da diluição em salina, da solução estoque.

Preparo da solução estoque - 1,0g de tribromoetanol é adicionado a 0,5g de álcool isoamílico terciário. Em seguida a solução é filtrada e estocada em frasco âmbar coberto com papel alumínio. A solução deve ser mantida em geladeira.

Solução de uso - diluir 0,12 ml da solução estoque em 10 ml de salina 0,154 M. No momento da diluição manter a temperatura em 40°C. Foram utilizados 0,02 - 0,03ml de solução para cada grama de peso corporal por via intraperitoneal. Os animais normalmente permanecem sedados por aproximadamente 25 minutos.

ANEXO 3

Teste de acasalamento para coloração de pelagem
(Linhagem albina X DBA/2)

Genótipo da linhagem DBA/2	Genótipo linhagens albinas	Genótipo e fenótipo dos animais F1
<i>C/C a/a b/b d/d</i> X	DBA/2	marrom
	<i>c/c a/a b/b D/D</i>	<i>C/c a/a b/b D/d</i>
	AKR	preto
	<i>c/c a/a B/B D/D</i>	<i>C/c a/a B/b D/d</i>
	BALB/c	marron-agouti
	<i>c/c A/A b/b D/D</i>	<i>C/c A/a b/b D/d</i>
	DDK	preto-agouti
	<i>c/c A/A B/B D/D</i>	<i>C/c A/a b/b d/d</i>
	HRS	cinza-amarelo
	<i>c/c A/A b/b D/D</i>	<i>C/c A/a b/b d/d</i>

E. Kozaburo, cap II Iclas Nomura. (27)

ANEXO 4

ENZIMA MÁLICA - (MOD 1)

Solução de revelação

Reagentes	Volumes
Tampão This-HCl 0,2M pH 8,0	35ml
DL-Malique 2M pH 7,0	5ml
MgCl ₂ 0,5M	300 μ l
NADP 1%	2ml
NBT 1%	1ml
PMS 1%	500 μ l
MTT 1%	1ml

ANEXO 5

GLUCOSE FOSFATO ISOMERASE - (Gpi)

Solução de revelação

Reagentes	Volumes
Tris-HCL 0,35M pH 8.0	1,0ml
NADP (4mg/ml)	0,2ml
Frutose 6-fosfato(3mg/ml)	0,2ml
Glucose 6-fosfato dehydrogenase	5 μ l
MTT (2mg/ml)	0,4ml
PMS (4mg/ml)	0,4ml

ANEXO 6

HEMOGLOBINA CADEIA BETA (Hbb)

Tampão de migração

Tampão Tris 90mM; EDTA 1,6mM e Ácido Bórico pH 8.4

Dithioethriol (DTE)

DTE (sal)	15,43mg
água destilada	1,0ml

Solução de alquilação estoque

Cistamina	112,6mg
DTE	0,1ml
Amoníaco 2.8%	0,5ml
Água destilada	0,9ml

No momento de uso esta solução deve ser diluída 5 vezes com água destilada.

Solução de coloração (Ponceau S)

Ponceau S 0,5% (W/V)
Sulfosalicílico 10,0% (W/V)

ANEXO 7

Extração de moléculas de DNA de alto peso molecular a partir do baço das linhagens isogênicas padrão.

Preparo das soluções.

SARCOSYL 1%

Reagente	Solução de uso
EDTA 0,5M	20 ml
Sarcosyl 10%	10 ml
água destilada	70 ml

RNase

Misturar 0,04 g do produto original em 3,9ml de H₂O destilada.

Adicionar os seguintes reagentes:

40 µl de Tris 1,0M Ph 7.4

12 µl de NaCl 5,0M

48 µl de água

Deixar em ebulição por 15min. á 100°C

PROTEINASE-K: Solução estoque - 2,0mg/ml

Pesar 16,7mg do produto original e dissolver em:

Sarcosyl 1%, (EDTA 0,1M - 8,35ml)

Proteinase-K: Solução de uso - Colocar 250ul para 4,0ml de Sarcosyl.

FENOL SATURADO

Juntar aos 250ml de fenol:

Tris 1,0M - 2,5ml

NaCl 5,0M - 0,5ml

EDTA 0,5M - 0,5ml

TAMPÃO SET:

SDS 0,5%, EDTA 5mM e Tris 50mM pH 7,4

TAMPÃO DE LISE:

Tris 50mM pH 8.0, EDTA 100mM pH 8.0 e Sarcosyl 1%

CLOROFÓRMIO

Adicionar 1/25 de álcool isoamílico

TAMPÃO DE DIÁLISE:

Tris 10mM pH 7.4; EDTA 1mM pH8.0

ANEXO 8

Tampões para eletroforese de DNA.

Tampão TAE 50 X:

Tampão utilizado no preparo do gel e no sistema de eletroforese.

Tris 2M; Ácido Acético Glacial; EDTA 0,5M

TBE 10 X:

Tampão utilizado no preparo do gel e no sistema de eletroforese.

Tris 0,89M; ácido bórico 55g EDTA 0,5M

ANEXO 9

Tampão de reação - A tabela abaixo resume seu preparo e a estocagem dos principais reagentes. Os volumes apresentados são suficientes para 20 amostras.

Tabela : Condições de estocagem e volumes utilizados no preparo do tampão de reação

Solução estoque	Volume utilizado μl	Estocagem
Tris 200mM, pH 8.4	31,3	temperatura ambiente
Tween 20, 2%	31,3	temperatura ambiente
KCL 1M	31,3	temperatura ambiente
MgCl ₂		4°
*(20mM, 40mM, 60mM ou 80mM)	31,3	
Primer A	6,25	4°
Primer B	6,25	4°
4mM dNTPs	31,3	-20°C
Taq Polymerase	3,15	-20°C
4,5 a 5,0UI/μl		

Após o preparo, a mistura A é rapidamente homogeneizada em Vortex e centrifugada a 12000rpm por 2 minutos.

*** É importante verificar a sua concentração antes do uso**

ANEXO 10

Reação de PCR

As soluções de reação para cada um dos primers utilizados, foi preparada como indicado nas tabelas abaixo.

Tampão básico para diluição das amostras

Tampão 10 X (sem MgCl ₂)	Volume utilizado
Tris-HCl 1M pH 8,0	1,0 ml
KCl 1M	5,0 ml
Tween 20	0,1 ml
água	3,9 ml
Volume final	10 ml

Preparo do tampão de reação. Volume suficiente para a diluição de 15 amostras de DNA

Reagentes	Volume utilizado
Tampão 10 X	37,5µl
dNTPs (4mM)	7,5µl
MgCl ₂ (*)	30,0µl
Primer R	5,25µl
Primer F	5,25µl
Taq Polymerase	1,5µl
água	213µl
volume final	300µl

(*) MgCl₂ 10mM; 15mM ou 20mM