



Controle reprodutivo em biotérios de criação de animais de laboratório com ênfase em roedores

Reproductive control in Rodents animals facilities

Luisa Maria Gomes de Macedo Braga¹

CellVet Medicina Veterinária Regenerativa, Porto Alegre, RS, Brasil.

¹Correspondência lgmacedo@gmail.com

Resumo

A pesquisa experimental utiliza em sua grande maioria ratos e camundongos. Os animais de laboratório são caracterizados pela sua genética (isogênicos ou heterogênicos) definida através de práticas reprodutivas sistemáticas (acasalamentos irmão x irmão ou randômicos). O conhecimento da biologia e genética destes é fundamental para que se estabeleçam controles reprodutivos capazes de evitar desperdícios espaciais, financeiros e sobretudo o descarte excessivo de excedentes. O uso de animais isogênicos elimina a variabilidade genética em experimentos, uma vez que possuem ao menos 98,2% de homozigose em seus alelos e formam uma linhagem onde as características genéticas e fenotípicas são únicas e exclusivas. O uso de linhagens permite a reprodutibilidade de experimentos ao longo do tempo e em diferentes laboratórios. Ao contrário, animais heterogênicos, chamados de estoque ou colônias que objetivam mimetizar a variabilidade genética de uma população, são mantidos em acasalamentos randômicos, não possuem uma genética definida e suas características fenotípicas podem variar entre laboratórios. Tanto um quanto o outro exigem esquemas reprodutivos rígidos para garantir a qualidade e fidedignidade dos experimentos.

Palavras-chave: isogênicos, heterogênicos, controle reprodutivo, camundongo, rato.

Abstract

The great majority of animals used in research are rats and mice. Laboratory animals are characterized by their genetic patterns (isogenic or heterogenic) defined through systematic breeding practices (brother vs. brother or random mating). It is fundamental to know their biology and genetics to establish reproductive controls in order to avoid spatial and financial waste and, more important, to avoid the excessive discarding of surpluses. The use of isogenic animals eliminates genetic variability in experiments, since they have at least 98.2% homozygoze in their alleles and form a lineage where the genetic and phenotypic characteristics are unique and exclusive. The use of lineages allows the reproducibility of experiments in different laboratories and along the time. On the other hand, heterogenic animals, called stock or colonies, that aim to mimic the genetic variability of a population, are kept in random mating, they do not have a defined genetic profile and their phenotypic characteristics can vary among laboratories. Both ways of breeding (isogenic or heterogenic) demand rigid reproductive schemes to ensure the quality and reliability of the experiments.

Keywords: isogenic, heterogenic, reproductive control, mouse, rat.

Introdução

Quando falamos em experimentação animal, estamos nos referindo a um estudo científico que utiliza animais, com o propósito de adquirir novos conhecimentos em áreas biológicas, médicas e veterinárias (Loew and Cohen, 2002). Para que estes conhecimentos sejam válidos, é necessário que a espécie animal utilizada seja capaz de fornecer a resposta adequada ao que nela será testado, que o pesquisador tenha profundo conhecimento sobre a etologia e biologia da espécie utilizada e o fornecedor desses animais tenha responsabilidade, conhecimento e comprometimento com a qualidade sanitária e genética do animal que disponibilizará para o estudo.

Segundo a Lei Federal 11.794, de 8 de outubro de 2008, todo o animal do filo Chordata, subfilo Vertebrata, quando utilizado em pesquisa, ensino ou testes diagnósticos, passa a ser considerado um animal experimental. No entanto, dados mundiais corroborados pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), demonstram que em torno de 80% dos animais utilizados em pesquisa, ensino ou teste diagnóstico, são Roedores e entre eles, em quase sua totalidade, Ratos e Camundongos. Dessa forma, esse resumo estará voltado para estas espécies (site MCTIC).

Entre os preceitos éticos para o uso de animais experimentais, os mais importantes e que permeiam a maioria das Leis que regem a experimentação animal no mundo e no Brasil, são os princípios dos 3R's, de Russel e Burch. Estes são definidos como: *Replament* (substituição), que recomenda a substituição do uso de animais, total ou parcialmente, sempre existirem métodos alternativos válidos e validados; *Reduction* (redução), que apoia a utilização de métodos matemáticos, estatísticos, reprodutivos (cálculos de colônia) e genéticos (uso de linhagens



definidas), ou qualquer outro método visando a redução do número de animais utilizados em protocolos experimentais. O último R indica o *Refinement* (refinamento) que propõe o uso de técnicas que minimizem o sofrimento e protejam o bem-estar dos animais durante os estudos, seja usando técnicas cirúrgicas menos invasivas, anestesia, analgesia, enriquecimento ambiental, controle ambiental, controle sanitário, pontos finais humanitários ou qualquer outra ação que promova ou amenize o sofrimento animal (Braga, 2009).

Parâmetros Comportamentais e Ambientais

A reprodução e o comportamento sexual de ratos e camundongos em biotérios, difere da natureza, sendo fortemente influenciada pelo comportamento, ambiente, sanidade e nutrição.

Os sentidos dos roedores, são diferentes dos humanos e afetam de forma significativa o seu comportamento sexual e reprodutivo. A sensibilidade olfativa é talvez o principal sentido destas espécies. Os odor dos feromônios, que são proteínas liberadas pela urina, saliva e pele, influenciam e modificam o comportamento de fêmeas. Esses feromônios, são capazes de provocar efeitos que podem sincronizar o ciclo estral de camundongos fêmeas alojadas em grupos (Efeito *Whiteen*), provocar anestro em fêmeas mantidas na ausência do odor de feromônios de machos (Efeito *Lee-Boot*) ou impedir a implantação dos embriões, quando a fêmea é colocada em presença de outro macho, logo após a cópula (Efeito *Bruce*) (Guénet, et al., 2015). Outro sentido que cabe ressaltar pela influência na reprodução é a audição. Eles escutam em infra e ultrassons e ruídos e vibrações que ultrapassem 85dB, diminuem significativamente a eficiência reprodutiva, o número de filhotes nascidos e aumentam a mortalidade de filhotes (Rasmussen, 2009). O fotoperíodo, a intensidade e a qualidade espectral da luz são fatores estressantes e podem comprometer a reprodução, influenciando a função ovariana e o ciclo estral (Kohn e Clifford, 2002). Ainda, a exposição a condições ambientais variáveis e extremas de temperatura, umidade e ventilação, também prejudicam estes animais que, por terem o metabolismo extremamente acelerado, e não se adaptam a variações bruscas de ambiente. Os aspectos nutricionais devem ser sempre avaliados, pois são difíceis de diagnosticar e são extremamente importantes para a fertilidade dos animais. Um exemplo importante é a deficiência de vitaminas C, B1 e B9, entre outras, que pode acontecer em rações autoclavadas, por serem essas substâncias muito sensíveis ao calor e ao mesmo tempo essenciais para reprodução. A restrição calórica entre 15-30% em ratos, pode levar a interrupção do ciclo estral e a atraso na maturidade sexual, fato este já demonstrado por Fox e Lion em 1970 (Kohn e Clifford, 2002).

Parâmetros Biológicos

Camundongos e ratos são mamíferos poliétricos, ovulam ao longo de todo o ano, tendo os camundongos, um pequeno declínio da fertilidade durante o inverno. As características reprodutivas são semelhantes, mas podem variar dentro da mesma espécie, de acordo com a linhagem ou estoque.

No camundongo a puberdade inicia entre 21 e 28 dias, entre 25 a 40 dias ocorre a abertura vaginal e entre 6 e 8 semanas inicia a ovulação (Guénet et al., 2015).

Os ratos nascem com a vagina fechada por um compacto epitélio, formando o chamado tampão vaginal. Ele inicia a degenerar ente os 25 a 30 dias e estará totalmente desfeito, em torno dos 40 a 80 dias. A persistência do tampão, pode ser uma das causas de infertilidade nessa espécie. A puberdade ocorre entre os 2 -3 meses nas fêmeas e nos machos o auge da produção de esperma acontece aos 75 dias (Kohn e Clifford, 2002).

O ciclo estral em ambas as espécies ocorre a cada 4-5 dias e é dividido em pró-estro, estro, metaestro e diestro. A ovulação ocorre normalmente 8-11hs após o início do estro e a cópula normalmente entre 24:00 e 2:00hs, dependendo do ciclo de luz. Após a cópula, em ambas as espécies, há a formação de um plug vaginal, que nada mais é do que um tampão ou um denso coágulo que se forma pelos fluidos seminais e fecha o lúmen vaginal. Ele permanece por 6-8 horas em camundongos e um período um pouco menor em ratos. Esse plug indica que a fêmea foi copulada, mas não necessariamente fertilizada. A idade ideal para acasalamentos nos camundongos é entre 6 e 8 semanas (Guénet et al., 2015) e ratos 65 a 110 dias (Harkness e Wagner, 1995). O período gestacional é de 21 a 23 dias em ratos e 19 a 22 dias em camundongos, variando com a linhagem ou estoque. O número de filhotes por fêmea varia de 8-14, de acordo com a linhagem ou estoque, sendo maior em criações heterogênicas do que em isogênicas. O desmame ocorre normalmente aos 21 dias. Ambas as espécies possuem o cio pós-parto fértil e o período reprodutivo dura de 6 a 8 partos, mas principalmente em camundongos, o número de filhotes por fêmea diminui após o quarto parto.

Camundongos e ratos devem ser substituídos dos acasalamentos entre 7-8 meses de idade (em algumas linhagens mutantes o desempenho reprodutivo ótimo pode ser menor) ou sempre que verificarmos que sua performance reprodutiva está regredindo.

Animais isogênicos e seu manejo reprodutivo

De acordo com o *International Committee on Standardized Nomenclature for Mice*, “uma linhagem só poderá ser denominada isogênica se ela tiver sido acasalada irmão x irmão, por 20 ou mais gerações consecutivas e os animais dessa linhagem poderem ser rastreados até um único par ancestral na vigésima ou subsequente geração”.



Nesse ponto a homozigose do genoma terá em média 98,2 a 99% de heterozigose residual (Guénet, et. al., 2015). Cada linhagem isogênica possui características fenotípicas únicas e igualdade genética.

Para a maioria das espécies mamíferas o cruzamento entre irmãos é deletério e pode levar inclusive a infertilidade, chegando a causar a extinção da linhagem. Todas essas manifestações adversas são referidas como tendo por causa a depressão endogâmica. Segundo Guénet et al., 2015, apud Charlesworth and Willis, 2009, esta depressão teria como causa predominante a presença de mutações recessivas deletérias nas populações naturais que iriam sendo progressivamente fixados em homozigose à medida que a endogamia progride. Ainda segundo os autores “a depressão endogâmica não é um problema sério para camundongos”, talvez porque provavelmente na natureza já estivessem sobrevivendo com uma porcentagem relativamente alta de consanguinidade.

Cada de cruzamentos entre irmãos, leva a letra F (filial). A maioria das linhagens isogênicas existentes nos laboratórios hoje, já está há décadas sendo cruzada, portanto, passando há anos da F20, algumas como a DBA/2, já passaram da F200. O importante é manter a os dados reprodutivos das linhagens. Caso o pesquisador receba uma linhagem isogênica sem a geração definida, ele pode continuar as gerações em sem biotério como F1, colocando em seus arquivos a referência F?+F1. Dessa forma, fica claro que quando a linhagem foi importada, não era conhecida a geração em que estava, mas a partir dali seguiu-se a contagem.

É essencial para o controle das linhagens isogênicas que seja mantido o histórico dos acasalamentos (gerações) e que o biotério defina técnicas para monitoramento genético. A presença de mutações ou contaminações precisa ser logo detectada, para não perder as características da linhagem. Existem diversas técnicas de monitoramento que vão desde transplante de pele entre os indivíduos da mesma linhagem, hoje em desuso devido a possibilidade de falsos positivos ou negativos, até técnicas baseadas em análises de DNA através de microssatélites ou SNIPs.

A preservação da pureza genética das linhagens isogênicas pode ser feita através da manutenção do núcleo da fundação em isoladores plásticos, totalmente isoladas de outros animais, ou através da criopreservação de embriões ou esperma, se possível (Glenister e Thornton, 2000).

A reprodução dos animais isogênicos deve sempre conter um núcleo reprodutivo ou colônia fundação com no mínimo 6 casais por geração, formada por acasalamento entre irmãos da mesma ninhada. Pode ser formada uma colônia Pedigree, onde o acasalamento também é entre irmãos, mas não necessariamente da mesma ninhada e podem ser mantidos 1 macho e duas fêmeas. Os esquemas reprodutivos estão bem detalhados no livro *Genetics of the Mouse*, escrito por Guénet et al., 2015, sendo este sempre comuns a qualquer linhagem isogênica, independente se for camundongo ou ratos.

Linhagens híbridas

Originadas do acasalamento entre duas linhagens isogênicas diferentes e mantidas apenas até a F1. Possuem o vigor híbrido e animais do mesmo sexo podem ser considerados como equivalentes a gêmeos idênticos ou clones.

Linhagens isogênicas mutantes

podem carregar mutações espontâneas, induzidas, específicas e transgenes. O fundo genético dessas linhagens se mantém idêntico ao da linhagem isogênica inicial, ocorrendo a variação em apenas um ou em todos os camundongos que carregam a mutação.

Coisogênicos: quando uma mutação ocorre no núcleo reprodutivo de uma linhagem isogênica e se assume que o novo alelo mutante substituiu o alelo original. Dessa forma a nova linhagem com o alelo mutante difere em apenas um específico locus da linhagem original. Os acasalamentos podem ser feitos entre irmãos mutantes ou se a mutação for inviável em homozigose, pode se acasalar um não mutante da linhagem original com um animal da nova linhagem mutante (Jacoby et al., 2002).

Congênicos: quando uma mutação ou gene é transferido de uma linhagem isogênica para outra por repetidos acasalamentos. A linhagem que carrega a mutação ou gene de interesse e é chamada de linhagem doadora e outra é chamada linhagem receptora ou linhagem do fundo genético. A cada geração é realizada uma genotipagem para identificar os animais com a mutação de interesse e estes são cruzados com a linhagem receptora e assim sucessivamente por 10 gerações. A partir da décima geração, os animais mutantes com o novo fundo genético passam a ser cruzados ente si (Guénet et al., 2015; Jacoby et al., 2002).

Transgênicos: Sempre que um fragmento de DNA é introduzido no genoma de um animal e transmitido aos seus descendentes, esse é uma animal transgênico.

Animais heterogênicos e seu manejo reprodutivo

São considerados heterogênicos, ou não consanguíneos, animais que não possuem genética definida. Provém de uma colônia de animais de laboratório na qual existe variabilidade genética, que deve ser mantida fechada por, no mínimo, quatro gerações e na qual se utilizam métodos de acasalamento que visam minimizar a homozigose ou isogenia entre as gerações, a qual, normalmente não deverá exceder 1 % por geração (Festing,



2010). Como eles não possuem uma genética definida, não podem ser chamados de linhagem e sim estoques ou colônias. Podem variar fenotipicamente entre laboratórios e não garantem a reprodutibilidade experimental ao longo dos anos, como acontece com os isogênicos. São mais férteis que os isogênicos e possuem maior vigor que estes por não possuírem depressão endogâmica. Quanto maior o número de animais que inicia uma colônia heterogênea, maior será a segurança da manutenção da variabilidade genética. O grau de heterozigose genética pode ser muito baixo em situações onde ocorre o fenômeno chamado de *bottle-neck effect*, quando, acidental ou intencionalmente, o número de animais que formam o pool de reprodutores é pequeno. Esse fato é comum quando se vai iniciar uma colônia e são importados poucos casais.

Os acasalamentos heterogênicos devem permitir que a população se mantenha constante em todas as suas características pelo maior número de gerações possíveis, mantendo o alto nível de heterozigose.

A colônia fundação deve ser: monogâmica, com uma população tão grande quanto possível: (o recomendado são 200 casais), mantida com acasalamentos randômicos para que todos os indivíduos tenham igual chance de participação, sem critérios de seleção para não fixar alelos, usar esquemas de métodos reprodutivos como: Poiley, Han-rotation, Robertson's, Falkoner, etc.. e fixar o tempo reprodutivo dos pares acasalados (ex: 30 semanas). É nesta colônia que se mantém todo o controle genético da manutenção da heterozigose.

A partir da colônia fundação, derivam as outras colônias de produção, poligâmicas, que devem atender a demanda de produção dos biotérios. Nas colônias de produção ou expansão, os acasalamentos são randômicos e são mantidos 1 macho com duas ou mais fêmeas (comum em camundongos) ou rotando o macho por uma ou duas semanas na caixa das fêmeas e mantendo as fêmeas prenhes agrupadas (mais comum m ratos).

Os métodos de acasalamentos mais utilizados para manutenção de colônias heterogênicas são o Poiley, que utiliza um esquema de grupos e pode ser usado para colônias com médio ou grande número de reprodutores e o Han- rotation, que utiliza o esquema de gerações e é recomendado para colônias onde o número de reprodutores é menor.

Considerações Finais

É essencial que todas as linhagens ou colônias mantidas em biotérios tenham um rígido controle de seus históricos reprodutivos e os mesmos devem ser avaliados a cada seis meses.

O uso de colônias heterogênicas deve ser muito bem avaliado pelos biotérios, pois se as mesmas não possuírem um número grande de reprodutores, a chance de consanguinidade é muito grande e dessa forma se perde a característica da variabilidade genética. Nesse caso, seria preferível acasalar múltiplas linhagens isogênicas, pois cada uma delas possui uma genética diferenciada e com certeza garantiria a heterogenia (Fasting, 2010).

A grande variedade de linhagens e colônias de ratos e camundongos que existem hoje para estudos, exige um treinamento e conhecimento profundos por parte dos responsáveis pelas criações, pois qualquer descuido na avaliação e manutenção dos padrões genéticos e reprodutivos, pode levar a perda da linhagem ou da colônia, com um enorme prejuízo para a pesquisa, além do gasto desnecessário.

Em qualquer criação de animais experimentais, atender os preceitos legais e éticos é fundamental. Na produção de animais, através de controles reprodutivos e genéticos estritos, o número de animais poderá ser reduzido, evitando-se descartes desnecessários. O refinamento também é possível, fornecendo condições ambientais e sanitárias ideais e enriquecimento ambiental sempre que possível. O bem-estar dos animais deve estar sempre em primeiro lugar, pois sem atender-lo, estaremos fornecendo animais inadequados para os usuários e ferindo a legislação nacional.

As instalações animais, precisam trabalhar junto com as Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUAs) das instituições, para que possam produzir apenas o necessário para os projetos aprovados, caso não comercializem os animais que produzem.

Referências

- Braga LMG**. Os 3 Rs. In: Lapchik, VBV, Mattaraia, VGM, Ko, GM (org). Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório. SP, Br, Editora Atheneu, p.29-36, 2009.
- Festing MFW**. Inbred Strains Should Replace Outbred Stocks in Toxicology, Safety Testing, and Drug Development. Toxicologic Pathology, v.38, p.681-90, 2010.
- Glenister PH, Thornton CE**. Cryoconservation-archiving for the future. Mamm Genome, v.11, p.565-571, 2000.
- Guénet JL, Benavides F, Panthier JJ, Montagutelli X**. Genetics of the Mouse. Berlin: Springer, p.408, 2015.
- Harkness, JE and Wagner, JE**. Biology and medicine of rabbits and rodents.4.ed. PA, USA: Willians & Wilkins, p. 372, 1995.
- Jacoby RO, Fox JG, Davisson M**. Biology and Diseases of Mice. In: Fox, JG, Anderson, LC, Loew, FM, Quimby, FW, Eds, 2.ed. Laboratory Animal Medicine. SD, USA: Academic Press, p.35-120, 2002.
- Kohn DF, Clifford CB**. Biology and Diseases of Rats. In: Fox, JG, Anderson, LC, Loew, FM, Quimby, FW, Eds, 2.ed. Laboratory Animal Medicine. SD, USA: Academic Press, p.121-165, 2002.
- Loew FM, Cohen BJ**. Laboratory Animal Medicine: Historical Perspectives. In: Fox, JG, Anderson, LC, Loew, FM, Quimby, FW, Eds, 2.ed. Laboratory Animal Medicine. SD, USA: Academic Press, p.1-17, 2002.



Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Ministério da Ciência Tecnologia e Informação, Brasília, DF.. [http://www.mct.gov.br/index.php/content/view/310553/Conselho_Nacional_de_Controlde_de_Experimentacao_Animal__CONCEA.html]. Accessed in: 15 de abril, 2017.

Rasmussen S, Glickman G, Norinsky R, Quimby FW, Tolwani RJ. Construction Noise Decreases Reproductive Efficiency in Mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, v.48, p.363-370, 2009.

The Jackson Laboratory. Bar Harbor, Maine: JAX- breeding estratégias. Available from: <http://www.research.uci.edu/forms/docs/iacuc/JAX-breeding-strategies.pdf>. Acessado em: 22 de abril, 2017.

The Jackson Laboratory. Bar Harbor, Maine: JAX- services. Available from: <https://www.jax.org/jax-mice-and-services/customer-support/technical-support/breeding-and-husbandry-support/colony-planning> Acessado em: 21 de abril, de 2017.
