

RECUPERAÇÃO DA LINHAGEM DE CAMUNDONGO BALB/c^{Pafr} ATRAVÉS DE ACASALAMENTOS DIRECIONADOS POR TESTES GENÉTICOS

Nadark de Amorim Silva

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo

Sandra Regina Alexandre-Ribeiro

sanreale@icb.usp.br

Objetivos

A descoberta de mutações espontâneas e o estabelecimento das mutações direcionadas em camundongos é fundamental para o desenvolvimento de modelos biológicos para pesquisas biomédicas e doenças genéticas humanas. As alterações nos genes envolvidos podem resultar em modificações nas funções bioquímicas ou interferir nos mecanismos da expressão gênica. Dentro da espécie, cada linhagem de camundongos apresenta uma forma alélica, mantida por meio de protocolos específicos de reprodução e controle genético, realizados como rotina nos ambientes de criação. Entretanto, algumas linhagens podem apresentar problemas reprodutivos com o passar das gerações, sendo necessárias diferentes estratégias de acasalamento para manutenção do patrimônio genético. A reação em cadeia da polimerase, ou PCR, é uma das principais técnicas na biologia molecular e que pode ser utilizada para o controle do padrão genético de seus animais. O presente projeto teve como objetivo a recuperação da linhagem de camundongos transgênicos BALB/c^{Pafr} mantida no Biotério de Matrizes do Departamento de Imunologia do ICB/USP por meio da realização de acasalamentos direcionados por teste de PCR.

Métodos e Procedimentos

Inicialmente, foram realizados acasalamentos entre 1 camundongo macho BALB/c^{Pafr}, cuja mutação do alelo do gene Pafr era previamente conhecida, e 2 fêmeas BALB/c para obtenção

de animais heterozigotos, geração F1. A partir do desmame da geração F1 híbrida, 2 fêmeas F1 foram retrocruzadas com o camundongo macho BALB/c^{Pafr}. Os animais obtidos na geração N2 foram genotipados por PCR, conforme protocolo de genotipagem otimizado pelo Laboratório de Controle Genético do Departamento de Imunologia ICB/USP. Posteriormente, os animais foram separados e acasalados conforme as recomendações de reprodução da linhagem em questão. Todo o estudo foi conduzido sem comprometer o bem-estar animal, seguindo as normas preconizadas pela FELASA, PREPARE Guidelines checklist.

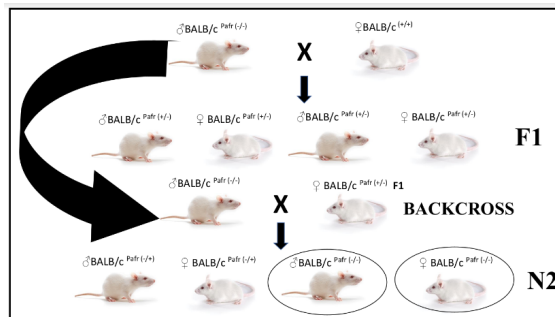


Figura 1: Esquema do acasalamento utilizado

Resultados

A geração F1 (heterozigota) foi composta por 3 filhotes, sendo 2 fêmeas e 1 macho. Já a geração N2, formada pelos descendentes obtidos através do retrocruzamento, foi composta por 4 filhotes, sendo 2 fêmeas e 2 machos. O resultado do PCR identificou que, dos 4 camundongos da geração N2, 50% de

camundongos eram homozigotos (1 macho e 1 fêmea) e 50% heterozigotos (1 macho e 1 fêmea) para o alelo do gene *Pafr*.

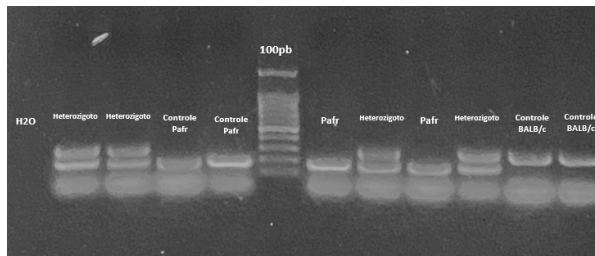


Figura 2: Gel agarose produto da PCR

Conclusões

A utilização da técnica de controle genético aliada ao estabelecimento de cruzamentos direcionados possibilitou a recuperação da linhagem BALB/c^{Pafr} e permitiu a implantação do método de recuperação como modelo para restabelecimento de outras linhagens que apresentem problemas reprodutivos, sem a necessidade de novas importações de casais de fundação.

Referências Bibliográficas

- Beck, J.A.; Lloyd, S.; Hafezparast, M.; Lennon-Pierce, M.; Eppig, J.T.; Festing, M.F.W.; Fischer, E.M.C. 2000. Genealogies of mouse inbred strains. *Nature Genetics*, 24: 23-25.
- Bressan, F.F. 2008. Produção de animais transgênicos por transferência nuclear como modelo de estudo biológico. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/Universidade de São Paulo, Pirassununga, São Paulo. 86pp.
- Caballero, A.; Keightley, P.D.; Hill, W.G. 1991. Strategies for increasing fixation probabilities of recessive mutations. *Genetics Research*, 58: 129-138.
- Casellas, J. 2011. Inbred mouse strains and genetic stability: a review. *Animal*, 5(1): 1-7.
- Guénet, J.; Benavides, F.J. 2009. Genetic Monitoring of Laboratory Rodents. *Molecular Diagnostics*, 31: 461-269.
- Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R et al. (1971) Studies on polynucleotides. XCVI. Repara replicações de DNAs sintéticos curtos catalisados por DNA polimerases. *J Mol Biol* 56 (2): 341–361.
- Mullis KB, Faloona FA (1987) Síntese específica de DNA in vitro via uma reação em cadeia catalisada por polimerase. *Methods Enzymol* 155: 335–350.
- Panet A, Khorana HG (1974) Studies on polynucleotides. A ligação de moldes de desoxirribopolinucleotídeos à celulose e seu uso na sua replicação. *J Biol Chem* 249 (16): 5213–5221.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F et al. (1985) Amplificação enzimática de sequências genômicas de beta-globina e análise de sítio de restrição para diagnóstico de anemia falciforme. *Science* 230 (4732): 1350–1354.
- Santos, B.F. 2002. Criação e manejo de camundongos. p: 115-118. In: Andrade, A.; Pinto, S.C.; Oliveira, R.S. *Animais de Laboratório: criação e experimentação*. V.1. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, BR.

RECOVERY OF THE BALB/c^{Pafr} MOUSE STRAIN BY GENETIC TEST

Nadark de Amorim Silva

School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo

Sandra Regina Alexandre-Ribeiro

sanreale@icb.usp.br

Objectives

The discovery of spontaneous mutations and the establishment of targeted mutations in mice is fundamental to the development of biological models for biomedical research and human genetic diseases. Alterations in the genes involved can result in changes in biochemical functions or interfere with the mechanisms of gene expression. Within the species, each strain of mice presents an allelic form, maintained through specific reproduction protocols and genetic control, which are performed as a routine in breeding environments. However, some strains can present reproductive problems over generations, requiring different mating strategies to maintain the genetic heritage. The polymerase chain reaction, or PCR, is one of the main techniques in molecular biology that can be used to control the genetic pattern of your animals. The objective of this project was to recover the BALB/cPafr transgenic mouse strain maintained in the Laboratory Animal Breeding of Department of immunology ICB/USP through the realization of mating directed by PCR testing.

Materials and Methods

Initially, matings were performed between 1 male BALB/cPafr mouse, whose allele mutation of the Pafr gene was previously known, and 2 female BALB/c to obtain heterozygous animals, F1 generation. From the weaning of the F1 hybrid generation, 2 F1 females were

backcrossed to the male BALB/cPafr mouse. The animals obtained in the N2 generation were genotyped by PCR, according to the genotyping protocol optimized by the Laboratory of Genetic Control of the Immunology Department ICB/USP. Subsequently, the animals were separated and crossed according to the breeding recommendations of the strain. The entire study was conducted following the standards recommended by FELASA and PREPARE Guidelines checklist.

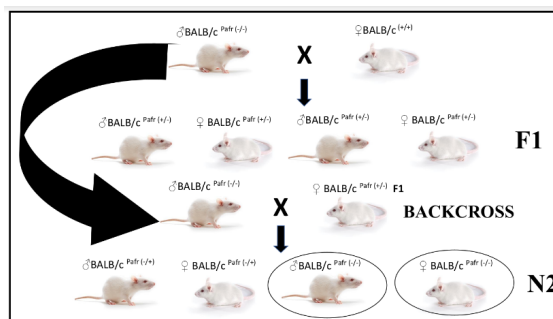


Figure 1: Mating Scheme

Results

The F1 (heterozygous) generation consisted of 3 offspring, 2 females and 1 male. The N2 generation, formed by the offspring obtained through backcrossing, was composed of 4 offspring, 2 females and 2 males. The PCR result identified that, from the 4 mice of the N2 generation, 50% were homozygous (1 male and 1 female) and 50% heterozygous (1 male and 1 female) for the allele of the Pafr gene.

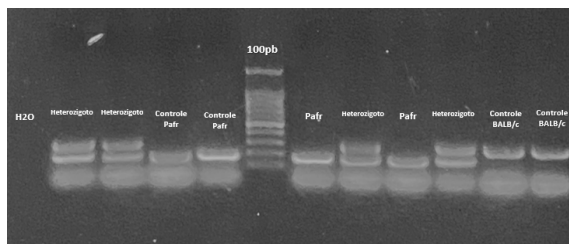


Figure 2: PCR product agarose gel

Conclusions

The use of the genetic control combined with the establishment of targeted crosses enabled the recovery of the BALB/c^{Pafv} strain and the implementation of the recovery method as a model for reestablishing other lines that present reproductive problems, without the need for new imports of foundation couples

References

- Beck, J.A.; Lloyd, S.; Hafezparast, M.; Lennon-Pierce, M.; Eppig, J.T.; Festing, M.F.W.; Fischer, E.M.C. 2000. Genealogies of mouse inbred strains. *Nature Genetics*, 24: 23-25.
- Bressan, F.F. 2008. Produção de animais transgênicos por transferência nuclear como modelo de estudo biológico. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/Universidade de São Paulo, Pirassununga, São Paulo. 86pp.
- Caballero, A.; Keightley, P.D.; Hill, W.G. 1991. Strategies for increasing fixation probabilities of recessive mutations. *Genetics Research*, 58: 129-138.
- Casellas, J. 2011. Inbred mouse strains and genetic stability: a review. *Animal*, 5(1): 1-7.
- Guénet, J.; Benavides, F.J. 2009. Genetic Monitoring of Laboratory Rodents. *Molecular Diagnostics*, 31: 461-269.
- Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R et al. (1971) Studies on polynucleotides. XCVI. Repara replicações de DNAs sintéticos curtos catalisados por DNA polymerases. *J Mol Biol* 56 (2): 341–361.
- Mullis KB, Faloona FA (1987) Síntese específica de DNA in vitro via uma reação em cadeia catalisada por polimerase. *Methods Enzymol* 155: 335–350.
- Panet A, Khorana HG (1974) Studies on polynucleotides. A ligação de moldes de desoxirribopolinucleotídeos à celulose e seu uso na sua replicação. *J Biol Chem* 249 (16): 5213–5221.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F et al. (1985) Amplificação enzimática de sequências genômicas de beta-globina e análise de sítio de restrição para diagnóstico de anemia falciforme. *Science* 230 (4732): 1350–1354.
- Santos, B.F. 2002. Criação e manejo de camundongos. p: 115-118. In: Andrade, A.; Pinto, S.C.; Oliveira, R.S. *Animais de Laboratório: criação e experimentação*. V.1. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, BR.