ANA TADA FONSECA BRASIL ANTIORIO

**Rederivação de linhagens de camundongos por transferência embrionária
para obtenção de colônias livres de patógenos específicos (SPF)**

São Paulo

2016

ANA TADA FONSECA BRASIL ANTIORIO

**Rederivação de linhagens de camundongos por transferência embrionária para
obtenção de colônias livres de patógenos específicos (SPF)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Profa. Dra. Claudia Madalena Cabrera Mori

São Paulo

2016

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3407
FMVZ

Antiorio, Ana Tada Fonseca Brasil
Rederivação de linhagens de camundongos por transferência embrionária para obtenção de colônias livres de patógenos específicos (SPF) / Ana Tada Fonseca Brasil Antiorio. -- 2016.
53 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profª. Dra. Claudia Madalena Cabrera Mori.

1. Camundongo SPF. 2. Rederivação. 3. Transferência embrionária. I. Título.

São Paulo, 13 de abril de 2015

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Rederivação de linhagens de camundongos por transferência embrionária para obtenção de colônias livres de patógenos específicos (SPF).", protocolado sob o CEUA nº 4733231214, utilizando 64 Camundongos isogênicos (14 machos e 50 fêmeas), 108 Camundongos Knockout (108 fêmeas), sob a responsabilidade de Cláudia Madalena Cabrera Mori, foi aprovado na reunião de 08/04/2015, e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "Rederivation of mice strains by embryo transfer to achieve specific pathogens free (SPF) colonies.", protocol number CEUA 4733231214, utilizing 64 Isogenics mice (14 males and 50 females), 108 Knockout mice (108 females), under the responsibility Cláudia Madalena Cabrera Mori, was approved in the meeting of day 04/08/2015, and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ANTIORIO, Ana Tada Fonseca Brasil

Título: Rederivação de linhagens de camundongos por transferência embrionária para obtenção de colônias livres de patógenos específicos (SPF)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabalho aos animais de laboratório!

AGRADECIMENTOS

A Deus e ao meu anjo da guarda.

Aos meus amores, Ricardo e Guilherme, por todo carinho e apoio.

Aos meus pais por todo incentivo e suporte.

À Profa. Claudia Mori por me aceitar como aluna e me orientar tão bem neste trabalho. Que venham muitos outros!

Aos colaboradores diretos deste trabalho, em especial Sílvia Massironi, Regina De Luca, Márcio Caldas e Vanessa Yamamoto.

Aos professores do ICB/USP, Momtchilo Russo, Ana Lepique e Niels Câmara pela ajuda e apoio institucional.

Aos meus colegas bioteristas do ICB/USP, Instituto Adolfo Lutz, Biotério Central da FM/USP e Unicamp.

Aos meus colegas do curso sobre reprodução assistida da FM/USP, em especial Joana Bom e Juliana Bortolatto.

Aos colegas, docentes e funcionários do Departamento de Patologia.

Aos funcionários da biblioteca Virginie Buff D'Ápice.

Muito obrigada!

*“O futuro não é um lugar onde estamos indo, mas um lugar que estamos criando.
O caminho para ele não é encontrado, mas construído e o ato de fazê-lo muda
tanto o realizador quando o destino. ”*

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

ANTIORIO, A. T. F. B. **Rederivação de linhagens de camundongos por transferência embrionária para obtenção de colônias livres de patógenos específicos (SPF).** [Rederivation of strains of mice by embryo transfer in order to achieve SPF colonies]. 2016. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A introdução de novas linhagens de camundongos em biotérios deve ser realizada com cautela devido aos riscos de introdução de doenças na colônia, motivo pelo qual alguns biotérios adotam como padrão introduzir novos animais somente após o processo de rederivação, que pode ser realizado por transferência embrionária, histerectomia ou “cross-fostering”. A rederivação é adotada para diversas espécies de animais de laboratório e constitui uma forma de reduzir o risco de surtos de doenças em um biotério com a consequente interferência na pesquisa e perdas, tanto do status sanitário como do bem-estar dos animais. Dentre esses métodos, a transferência de embriões nos estágios de pré-implantação é considerada mais segura que os outros métodos utilizados para se rederivar linhagens de camundongos por reduzir os riscos da transmissão vertical de patógenos. Essa técnica é adotada em diversos biotérios internacionais, porém não é rotina em biotérios do Brasil. O objetivo desse trabalho foi implantar a técnica de rederivação por transferência de embriões no estágio de duas células, no biotério de camundongos livres de patógenos específicos (SPF) do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. As transferências embrionárias foram realizadas para introdução de linhagens de camundongos procedentes de diferentes biotérios convencionais sem barreiras. Os embriões foram obtidos pelos métodos naturais, por meio do acasalamento das fêmeas doadoras superovuladas, com machos de genótipo ou fundo genético igual. Os embriões foram coletados por “flushing” e lavados em meio estéril. Realizou-se a transferência de embriões no estágio de duas células para fêmeas receptoras livres de patógenos específicos (SPF), pseudoprenhas no 0,5 dia pós coito (d.p.c.). Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados em condições assépticas. Total de 881 embriões, destes, 625 foram transferidos para rederivação de 18 linhagens de camundongos. Nasceram 148 filhotes vivos, dos quais 140 foram desmamados. Os seguintes patógenos foram eliminados pela técnica: vírus da hepatite murina, norovírus, *Corynebacterium kutscheri*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* beta hemolítico, *Bordetella bronchiseptica* e protozoários intestinais. Os dados apresentados foram obtidos da rotina do biotério num período de três anos. A implantação da técnica possibilitou a introdução de novas linhagens na criação,

em condições sanitárias satisfatórias, com a consequente disponibilização de modelos animais com nível sanitário adequado à experimentação para a comunidade científica.

Palavras-chave: Camundongo SPF. Rederivação. Transferência embrionária.

ABSTRACT

ANTIORIO, A. T. F. B. **Rederivation of strains of mice by embryo transfer in order to achieve SPF colonies.** [Rederivação de linhagens de camundongos por transferência embrionária para obtenção de colônias livres de patógenos específicos (SPF)]. 2016. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

The introduction of new strains of mice should be performed carefully to avoid breaking sanitary barriers of specific pathogen free (SPF) animal facilities. In order to meet this need, animals should be rederived by embryo transfer, hysterectomy or cross-fostering and then maintained under strict biosecurity practices. Rederivation is a technique used in different species of laboratory animals to protect them from infectious agents, minimize risks of disease outbreaks and thus avoid research interference caused by loss of the health status and welfare of the animals. Among these techniques, embryo transfer at two cell stage should rather be implemented because it avoids post implantational vertical transmissions of infections. It is routine to introduce animals by embryo transfer in most animal facilities in the United States of America and Europe, however it is not seen in Brazilians' rodents vivariums. The objective was to implement mice embryo transfer technique in the animal facility of the Department of Immunology of the Institute of Biomedical Science of the University of Sao Paulo, Brazil. Embryo transfers were performed to rederive strains of mice received from different sources. Fertilized eggs at two-cell stage were obtained by mating superovulated females with fertile males that had either the same genotype or the same genetic background. Embryos were collected by flushing of the oviducts and washed in sterile medium. Under general anesthesia, embryos were transferred into the oviducts of specific pathogen free (SPF) pseudo pregnant female mice at 0,5 - day post coitus (d.p.c.). All the surgical procedures were performed under aseptic conditions. Total of 881 embryos, out of these, 625 embryos at two-cell stage were transferred to rederive 18 mouse strains. It was born 148 pups, of which 140 were reared. The following mouse pathogens were eliminated by embryo transfer technique: Mouse hepatitis virus, Norovirus, *Corynebacterium kutscheri*, *Staphylococcus aureus*, Beta-Haemolytic *Streptococci*, *Bordetella bronchiseptica* and intestinal protozoa. Data were collected from routine laboratory in a period of two years. The improvement in the microbiological status of mice allowed their expansion in our SPF facility and the distribution of better models to the scientific community.

Keywords: SPF mouse. Rederivation. Embryo transfer.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
	CAPÍTULO 1: DESEMPENHO REPRODUTIVO DE 20 LINHAGENS DE CAMUNDONGOS GENETICAMENTE MODIFICADOS (OGMS) SUBMETIDAS À TRANSFERÊNCIA EMBRIONÁRIA PARA OBTENÇÃO DE COLÔNIAS SPF	19
2	INTRODUÇÃO	22
2.1	MATERIAIS E MÉTODOS	23
2.1.1	Biotério: condições ambientais e manejo dos animais	23
2.1.2	Grupo de machos vasectomizados	24
2.1.3	Diluição de hormônios e preparo do meio para manipulação de embriões	24
2.1.4	Grupo das fêmeas doadoras de embriões	25
2.1.5	Retirada de ovidutos e lavagem de embriões por “flushing”	26
2.1.6	Grupo das fêmeas receptoras e transferência dos embriões	27
2.1.7	Controles sanitário e genético	29
2.1.8	Análise estatística	29
2.2	RESULTADOS	30
2.2.1	Desempenho reprodutivo das linhagens	30
2.2.2	Controle Genético	33
2.2.3	Controle Sanitário	33
2.3	DISCUSSÃO	35
2.4	CONCLUSÃO	40
	REFERÊNCIAS	41
	APÊNDICE A	48
3	CONSIDERAÇÕES	51
	REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

A transferência de animais e germoplasmas entre diversos biotérios pode causar a disseminação de agentes patogênicos com o consequente impacto na saúde e bem-estar dos animais e no desenvolvimento da pesquisa (BAKER, 1998; FRAY et al., 2008; MAHABIR; BAUER; SCHMIDT, 2008). Assim, a introdução de novas linhagens de camundongos em biotérios com barreiras deve ser realizada por meio de técnicas de rederivação que permitem a obtenção de animais com padrão sanitário superior. (REETZ; WULLEMWEBER-SCHIMIDT; HEDRICH, 1988; INZUNZA et al., 2005).

A rederivação pode ser realizada em diferentes espécies de animais de laboratório por meio de transferência de embriões em fase pré ou pós implantacionais, por cesariana ou por “cross fostering”. (GARY; WRIGHT, 1977; DAVIS, 1981; WATSON; THOMPSON; FELDMAN, 2005; GLAGE et al., 2007; COMPTON, 2008).

Embriões em fase de pré-implantação obtidos por métodos naturais ou fertilização in vitro, são transferidos cirurgicamente para os ovidutos de fêmeas receptoras livres de patógenos específicos ou axênicas. É considerado um método efetivo para eliminação de doenças causadas por diferentes patógenos que acometem os camundongos de laboratório, tanto em infecções naturais como em condições experimentais. (CARTHEW; WOOD; KIRBY, 1983; REETZ; WULLEMWEBER-SCHIMIDT; HEDRICH, 1988; SUZUKI et al., 1996; VAN KEUREN; SAUNDERS, 2004; BESSELSSEN et al., 2008). Além disso, a rederivação associada com barreiras sanitárias estritas, mantém colônias de camundongos livres de contaminações por agentes infecciosos por um longo período de tempo (STEHR et al., 2009; NICKLAS; KEUBLER; BLEICH, 2015).

Dentro do contexto dos 3 Rs (Replacement/ Refinement/ Reduction) na prática em experimentação animal, a rederivação promove a redução do número de animais a serem utilizados em cada estudo e ao refinamento devido ao uso de animais com nível sanitário definido (RUSSEL; BURCH, 1959; MORRELL, 1999).

O presente trabalho descreve a implantação da técnica de transferência de embriões para a introdução de linhagens geneticamente modificadas de camundongos procedentes de diferentes biotérios convencionais sem barreiras, no Biotério de Camundongos do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP). O biotério adota como regra o recebimento de animais diretamente na criação, somente aqueles procedentes de criações reconhecidamente idôneas. Animais possivelmente contaminados

devem permanecer no biotério de quarentena até serem submetidos à rederivação. Com o uso de sentinelas verificou-se a presença dos seguintes patógenos nesta área: vírus da hepatite murina (MHV), norovírus (MNV), *Corynebacterium kutscheri*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* beta hemolítico, *Bordetella bronchiseptica*, *Tritrichomonas minuta*, *Tritrichomonas muris* e *Chilomastix bettencourti*.

Por meio dos métodos naturais (acasalamento) foram obtidos um total de 881 embriões, destes, 625 foram transferidos para rederivação de 18 linhagens de camundongos. Nasceram 148 filhotes vivos, dos quais 140 foram desmamados. Todos os agentes previamente encontrados foram eliminados e os filhotes foram selecionados conforme a mutação específica da linhagem para formarem novas matrizes.

As doenças que acometem os camundongos de laboratório interferem em diversos aspectos da pesquisa biomédica, além do que na maioria dos casos, especialmente vírus, recomenda-se o descarte de todos os animais, desinfecção e vazão sanitário. Em linhagens especiais que não podem ser adquiridas de outros biotérios, essas medidas seriam inviáveis. Nos quadros abaixo estão relacionados os principais agentes infecciosos encontrados nos animais de laboratório, sua interferência com a pesquisa e os métodos mais eficazes para sua eliminação.

Essa técnica é adotada em diversos biotérios internacionais, porém não é rotina em biotérios do Brasil, dessa maneira esse trabalho promove a divulgação da técnica e ressalta a importância da manutenção de animais com status sanitário adequado. Os dados apresentados foram obtidos da rotina do biotério num período de três anos. A implantação da técnica possibilitou a introdução de novas linhagens na criação, em condições sanitárias satisfatórias, com a consequente disponibilização de modelos animais com nível sanitário adequado à experimentação para a comunidade científica.

Nesse sentido, a presente dissertação foi apresentada no formato de artigo científico intitulado “Desempenho reprodutivo de 20 linhagens de camundongos geneticamente modificados (OGMs) submetidas à transferência embrionária para obtenção de colônias SPF”, o qual será submetido para publicação na revista **Transgenic Research**, especializada em biotecnologia aplicada a modelos animais geneticamente modificados.

Quadro 1 - Principais bactérias monitoradas em animais de laboratório, sua interferência com a pesquisa e os métodos mais eficazes para sua eliminação.

(Continua)

Agente etiológico	Animais de laboratório afetados	Interferência com a pesquisa	Método para obtenção de colônias livres do patógeno
<i>Streptococcus</i> B hemolítico	CA; CO; RA	Apenas em animais imunossuprimidos	Rederivação por TE ou HI
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	CO; COE; CA; RA	Pesquisas com trato respiratório	Rederivação por TE ou HI
<i>Citrobacter rodentium</i>	CA; GE	Filhotes, animais imunodeficientes e pesquisas com E. coli	Rederivação por TE ou HI
CAR <i>Bacillus</i>	RA; CA; COE	Pesquisas com trato respiratório	Rederivação por TE ou HI; tratamento prévio antes da rederivação com antibiótico
<i>Clostridium piliforme</i>	RO; COE	Animais clinicamente doentes	Rederivação por TE ou HI
<i>Corynebacterium bovis</i>	CA; RA	Perda de peso, lesões na pele, prurido, redução na fixação de tumores transplantáveis	Rederivação por TE ou HI
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	RA; CA; HAM	Animais portadores não podem ser utilizados em pesquisa	Rederivação por TE ou HI
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	COE; CO; CA	Pesquisas em imunologia e toxicologia; lesões granulomatosas nos pulmões, fígado e rins	Rederivação por TE; possível transmissão vertical, portanto a HI não é recomendada
<i>Helicobacter</i> spp	Todas as espécies de mamíferos	Pesquisas com trato digestório; linhagens susceptíveis por ex. A/J associação com casos de carcinoma hepatocelular	Rederivação por TE ou HI
<i>Klebsiella</i> spp	Todas as espécies de mamíferos	Estudos de sepse por bactérias Gram - ou pneumonia por <i>Klebsiella</i>	Rederivação por TE ou HI
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	CA; RA; CO; HAM	Animais clinicamente doentes; imunossupressão	Rederivação por TE; tratamento prévio antes da rederivação com antibiótico; transmissão vertical, portanto a HI não é recomendada

Fonte: <http://www.criver.com/customer-service/resources/infectious-agent-information> Legenda: RO= roedores de laboratório em geral; CA= camundongo; CO= cobaia; RA= rato; HAM= hamster; COE=coelho; GE= gerbil; TE= transferência embrionária; HI= histerectomia.

(Conclusão)

Agente etiológico	Animais de laboratório afetados	Interferência com a pesquisa	Método para eliminação do patógeno
<i>Pasteurella multocida</i>	COE; raro em CA e RA	Animais portadores não podem ser utilizados em pesquisa; zoonose	Rederivação por TE ou HI
<i>Pasteurella pneumotropica</i>	RA; CA	Portadores podem ser utilizados a menos que clinicamente doentes	Rederivação por TE; transmissão vertical, portanto deve ser feito tratamento prévio com antibiótico antes da HI
<i>Pneumocystis</i> spp.	CA; RA; COE	Morbidade e mortalidade significativa em animais imunossuprimidos; pneumonia intersticial em ratos imunocompetentes	Rederivação por TE ou HI
<i>Proteus</i> spp.	Maioria dos vertebrados	Estudos com o microrganismo; animais imunossuprimidos; animais que serão submetidos à cirurgia	Rederivação por TE ou HI
<i>Pseudomonas</i> spp.	Maioria dos animais e plantas	Sinais clínicos em animais neutropênicos; estudos com fibrose cística	Rederivação por TE ou HI
<i>Salmonella</i> entérica	RO	Animais portadores não podem ser utilizados em pesquisa; zoonose	Rederivação por TE; possível transmissão vertical, portanto deve ser realizado controles nos filhotes
<i>Staphylococcus aureus</i>	RO	Animais portadores podem ser utilizados em pesquisa a menos que clinicamente doentes; linhagens susceptíveis ou imunodeficientes podem apresentar infecções piogênicas na pele, olhos e trato genital	Rederivação por TE ou HI
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	CA; RA; GE; CO	Animais portadores não podem ser utilizados em pesquisa; zoonose	Rederivação por TE ou HI
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	RA; CO; CA	Portadores podem ser utilizados a menos que clinicamente doentes	Rederivação por TE ou HI

Fonte: <http://www.criver.com/customer-service/resources/infectious-agent-information>.

Legenda: RO= roedores de laboratório em geral; CA= camundongo; CO= cobaia; RA= rato; HAM= hamster; COE=coelho; GE= gerbil; TE= transferência embrionária; HI= histerectomia.

Quadro 2 - Principais viroses monitoradas em animais de laboratório, sua interferência com a pesquisa e os métodos mais eficazes para sua eliminação.

(Continua)

Agente etiológico	Animais de laboratório afetados	Interferência com a pesquisa	Método para eliminação do patógeno
Ectromelia (mousepox)	CA	100% de mortalidade em linhagens susceptíveis, como A, CBA, C3H e BALB/c; linhagens resistentes são fontes de infecção	Rederivação por TE ou HI
Hantavirus (Bunyaviridae)	RO	Animais infectados não podem ser utilizados em pesquisa; zoonose	Rederivação por TE ou HI
Vírus da elevação da lactato desidrogenase (LDV, LDHV; Arteriviridae)	CA	Pesquisas com imunologia	Rederivação por TE ou HI em colônias com infecções prolongadas, porém há risco de transmissão vertical na primeira semana de infecção ou em fêmeas no início de gestação
Coriomeningite linfocítica (LCMV; Arenaviridae)	CA, HAM	Animais infectados não podem ser utilizados em pesquisa; zoonose	Rederivação por TE; há transmissão vertical, portanto, deve ser realizado controles nos filhotes
Adenovirose (MadV-1, MadV-2, MAV; Adenovírus)	CA	Aumento da susceptibilidade de pielonefrite induzida por E. coli	Rederivação por TE ou HI
Cytomegalovirus (MCMV; Herpesviridae)	CA	Alterações no sistema imune, reprodutivo e hematopoiético	Rederivação por TE; possível transmissão vertical, portanto a HI não é recomendada
Hepatite murina (MHV; Coronaviridae)	CA	Acomete o sistema linfático; alterações nas enzimas hepáticas, reduz regeneração em hepatectomias parciais, provoca anemia, leucopenia e trombocitopenia	Rederivação por TE ou HI

Fonte: <http://www.criver.com/customer-service/resources/infectious-agent-information>

Legenda: RO= roedores de laboratório em geral; CA= camundongo; CO= cobaia; RA= rato; HAM= hamster; COE= coelho; GE= gerbil; TE= transferência embrionária; HI= histerectomia.

(Conclusão)

Agente etiológico	Animais de laboratório afetados	Interferência com a pesquisa	Método para eliminação do patógeno
Parvovirose (MPV-1, MPV-2, MPV-3, MVM; Parvoviridae)	CA	Pesquisas com imunologia	Rederivação por TE ou HI
Rotavirose (Diarreia epizootica do camundongo jovem, EDIM; Reoviridae)	CA	Pesquisas com animais jovens; alterações na absorção intestinal e concentração de enzimas	Rederivação por TE ou HI
Vírus Tímico do camundongo (MTV, MTLV; Herpesviridae)	CA	Doenças autoimunes em algumas linhagens	Rederivação por TE ou HI
Norovírus (MNV)	CA	Pesquisas com imunologia, o vírus se replica nos macrófagos	Rederivação por TE ou HI
Vírus da Pneumonia (PVM)	CA, RA, CO, GE e COE	Animais imudeficientes apresentam pneumonia intersticial progressiva	Rederivação por TE ou HI
Reovirus (REO 3)	CA, RA, CO e HAM	Em infecções experimentais há alterações nos níveis de citocina, na fixação de tumores, clearance bacteriano dos pulmões e funções hepáticas	Rederivação por TE ou HI
Vírus Sendai (PI-1, SV)	CA, RA, CO e HAM	Pneumonia e morte em animais jovens, infertilidade, animais infectados não podem ser utilizados em pesquisa	Rederivação por TE ou HI
Theilovirose (GDVII)	CA e RA	Encefalomielite fatal e desmielinização, interferência nos sistemas imune, nervoso e mio esquelético	Rederivação por TE ou HI

Fonte: <http://www.criver.com/customer-service/resources/infectious-agent-information>.

Legenda: RO= roedores de laboratório em geral; CA= camundongo; CO= cobaia; RA= rato; HAM= hamster; COE= coelho; GE= gerbil; TE= transferência embrionária; HI= histerectomia.

Quadro 3 - Protozoários, ecto e endoparasitas monitorados em animais de laboratório, sua interferência com a pesquisa e os métodos mais eficazes para sua eliminação.

Agente etiológico	Animais de laboratório afetados	Interferência com a pesquisa	Método para eliminação do patógeno
Protozoários	RO	Sinais gastrointestinais em animais jovens ou imunocomprometidos	Rederivação por TE ou HI
Ectoparasitas (sarnas)	RO	Animais infectados não podem ser utilizados em pesquisa; zoonose	Rederivação por TE ou HI
Endoparasitas	RO	Alterações nas respostas imunes; condição sanitária da colônia inadequada	Rederivação por TE ou HI

Fonte: <http://www.criver.com/customer-service/resources/infectious-agent-information>.

Legenda: RO= roedores de laboratório em geral; TE= transferência embrionária; HI= histerectomia.

**CAPÍTULO 1: DESEMPENHO REPRODUTIVO DE 20 LINHAGENS DE
CAMUNDONGOS GENETICAMENTE MODIFICADOS (OGMs) SUBMETIDAS À
TRANSFERÊNCIA EMBRIONÁRIA PARA OBTENÇÃO DE COLÔNIAS SPF**

RESUMO

A introdução de novas linhagens de camundongos em biotérios deve ser realizada com cautela devido aos riscos de introdução de doenças na colônia, motivo pelo qual alguns biotérios adotam como padrão introduzir novos animais somente após o processo de rederivação, que pode ser realizado por transferência embrionária, histerectomia ou “cross-fostering”. A rederivação é adotada para diversas espécies de animais de laboratório e constitui uma forma de reduzir o risco de surtos de doenças em um biotério com a consequente interferência na pesquisa e perdas, tanto do status sanitário como do bem-estar dos animais. Dentre esses métodos, a transferência de embriões nos estágios de pré-implantação é considerada mais segura que os outros métodos utilizados para se rederivar linhagens de camundongos por reduzir os riscos da transmissão vertical de patógenos. Essa técnica é adotada em diversos biotérios internacionais, porém não é rotina em biotérios do Brasil. O objetivo desse trabalho foi implantar a técnica de rederivação por transferência de embriões no estágio de duas células, no biotério de camundongos livres de patógenos específicos (SPF) do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. As transferências embrionárias foram realizadas para introdução de linhagens de camundongos procedentes de diferentes biotérios convencionais sem barreiras. Os embriões foram obtidos pelos métodos naturais, por meio do acasalamento das fêmeas doadoras superovuladas, com machos de genótipo ou fundo genético igual. Os embriões foram coletados por “flushing” e lavados em meio estéril. Realizou-se a transferência de embriões no estágio de duas células para fêmeas receptoras livres de patógenos específicos (SPF), pseudoprenhas no 0,5 dia pós coito (d.p.c.). Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados em condições assépticas. Total de 881 embriões, destes, 625 foram transferidos para rederivação de 18 linhagens de camundongos. Nasceram 148 filhotes vivos, dos quais 140 foram desmamados. Os seguintes patógenos foram eliminados pela técnica: vírus da hepatite murina, norovírus, *Corynebacterium kutscheri*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* beta hemolítico, *Bordetella bronchiseptica* e protozoários intestinais. Os dados apresentados foram obtidos da rotina do biotério num período de três anos. A implantação da técnica possibilitou a introdução de novas linhagens na criação, em condições sanitárias satisfatórias, com a consequente disponibilização de modelos animais com nível sanitário adequado à experimentação para a comunidade científica.

Palavras-chave: Camundongo SPF. Rederivação. Transferência embrionária.

ABSTRACT

The introduction of new strains of mice should be performed carefully to avoid breaking sanitary barriers of specific pathogen free (SPF) animal facilities. In order to meet this need, animals should be rederived by embryo transfer, hysterectomy or cross-fostering and then maintained under strict biosecurity practices. Rederivation is a technique used in different species of laboratory animals to protect them from infectious agents, minimize risks of disease outbreaks and thus avoid research interference caused by loss of the health status and welfare of the animals. Among these techniques, embryo transfer at two cell stage should rather be implemented because it avoids post implantational vertical transmissions of infections. It is routine to introduce animals by embryo transfer in most animal facilities in the United States of America and Europe, however it is not seen in Brazilians' rodents vivariums. The objective was to implement mice embryo transfer technique in the animal facility of the Department of Immunology of the Institute of Biomedical Science of the University of Sao Paulo, Brazil. Embryo transfers were performed to rederive strains of mice received from different sources. Fertilized eggs at two-cell stage were obtained by mating superovulated females with fertile males that had either the same genotype or the same genetic background. Embryos were collected by flushing of the oviducts and washed in sterile medium. Under general anesthesia, embryos were transferred into the oviducts of specific pathogen free (SPF) pseudo pregnant female mice at 0,5 - day post coitus (d.p.c.). All the surgical procedures were performed under aseptic conditions. Total of 881 embryos, out of these, 625 embryos at two-cell stage were transferred to rederive 18 mouse strains. It was born 148 pups, of which 140 were reared. The following mouse pathogens were eliminated by embryo transfer technique: Mouse hepatitis virus, Norovirus, *Corynebacterium kutscheri*, *Staphylococcus aureus*, Beta-Haemolytic *Streptococci*, *Bordetella bronchiseptica* and intestinal protozoa. Data were collected from routine laboratory in a period of two years. The improvement in the microbiological status of mice allowed their expansion in our SPF facility and the distribution of better models to the scientific community.

Keywords: SPF mouse. Rederivation. Embryo transfer.

2 INTRODUÇÃO

A transferência de animais e germoplasmas entre diversos biotérios pode causar a disseminação de agentes patogênicos com o consequente impacto na saúde e bem-estar dos animais e no desenvolvimento da pesquisa (BAKER, 1998; FRAY et al., 2008; MAHABIR; BAUER; SCHMIDT, 2008). Assim, a introdução de novas linhagens de camundongos em biotérios com barreiras deve ser realizada por meio de técnicas de rederivação que permitem a obtenção de animais com padrão sanitário superior. (REETZ; WULLEMWEBER-SCHIMIDT; HEDRICH, 1988; INZUNZA et al., 2005).

A rederivação pode ser realizada em diferentes espécies de animais de laboratório por meio de transferência de embriões em fase pré ou pós implantacionais, por cesariana ou por “cross fostering”. (GARY; WRIGHT, 1977; DAVIS, 1981; WATSON; THOMPSON; FELDMAN, 2005; GLAGE et al., 2007; COMPTON, 2008).

Embriões em fase de pré-implantação obtidos por métodos naturais ou fertilização in vitro, são transferidos cirurgicamente para os ovidutos de fêmeas receptoras livres de patógenos específicos ou axênicas. É considerado um método efetivo para eliminação de doenças causadas por diferentes patógenos que acometem os camundongos de laboratório, tanto em infecções naturais como em condições experimentais. (CARTHEW; WOOD; KIRBY, 1983; REETZ; WULLEMWEBER-SCHIMIDT; HEDRICH, 1988; SUZUKI et al., 1996; VAN KEUREN; SAUNDERS, 2004; BESSELSSEN et al., 2008). Além disso, a rederivação associada com barreiras sanitárias estritas, mantém colônias de camundongos livres de contaminações por agentes infecciosos por um longo período de tempo (STEHR et al., 2009; NICKLAS; KEUBLER; BLEICH, 2015).

Dentro do contexto dos 3 Rs (Replacement/ Refinement/ Reduction) na prática em experimentação animal, a rederivação promove a redução do número de animais a serem utilizados em cada estudo e ao refinamento devido ao uso de animais com nível sanitário definido (RUSSEL; BURCH, 1959; MORRELL, 1999).

O presente trabalho descreve a implementação da técnica de transferência de embriões para a introdução de linhagens geneticamente modificadas de camundongos no Biotério do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP). Apresentamos os resultados reprodutivos, os controles sanitários e os pontos mais relevantes da implantação da técnica. Os dados foram obtidos da rotina do biotério num período de três anos.

2.1 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1.1 Biotério: condições ambientais e manejo dos animais

O biotério de camundongos do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP), mantém a colônia de criação em condições livres de patógenos específicos (SPF) por meio de barreiras físicas, controle das condições ambientais, do manejo e da introdução de novos animais. As linhagens de camundongos mantidas são isogênicas e geneticamente modificadas, na sua grande maioria imunodeficientes. Paralelamente há uma área de quarentena isolada em outro andar do prédio, aonde foram alojados os animais com padrão sanitário não definido procedentes de diferentes instituições, que foram submetidos ao processo de rederivação e posteriormente transferidos para a área de criação SPF. Os animais foram alojados e mantidos conforme a legislação brasileira para o cuidado e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa. O número de animais e os procedimentos experimentais utilizados nesse trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Instituição.

Os animais foram mantidos em gaiolas individualmente ventiladas de polissulfona forradas com maravalha de pinus. As gaiolas foram alojadas em racks ventiladas com filtro absoluto e o manejo dos animais foi realizado em cabines de fluxo laminar unidirecional. Todos os materiais e insumos utilizados na área com barreiras foram esterilizados em autoclave validada. A equipe do biotério realizou a higiene pessoal com banho e utilizou uniforme, máscara, touca e luvas para o manuseio dos animais. O fluxo de materiais e animais foi realizado de forma unidirecional para reduzir o risco de contaminações cruzadas. As condições ambientais foram mantidas com ventilação e exaustão controladas com mínimo de 20 trocas de ar/hora, temperatura entre 22° C +/- 2, umidade relativa 50 % +/- 5 e iluminação 12hs claro/12hs escuro. A alimentação oferecida foi ração comercial peletizada (Nuvilab CR-1 autoclavável) única para todas as fases de vida do animal e água acidificada ad libitum.

2.1.2 Grupo de machos vasectomizados

Os machos vasectomizados foram utilizados para acasalar com as fêmeas receptoras para obtenção de pseudogestantes. Foi realizada a vasectomia em 14 machos B6CBAF1 e CD1, com oito semanas de idade, todos criados no biotério do ICB/USP. Sob anestesia geral, o procedimento foi realizado via escrotal no qual foi cauterizado o ducto deferente com pinça anatômica aquecida em chama de lamparina. A anestesia foi induzida por acepran 0,2%, dose 2 mg/kg, cloridrato de cetamina 10%, dose 100mg/kg e cloridrato de xilazina 2%, dose 10mg/kg, via intraperitoneal (ARRAS et al., 2001; BUITRAGO et al., 2008; FLECKNELL, 2009). Utilizou-se soro fisiológico estéril para prevenir o ressecamento corneal durante a cirurgia. Após o procedimento cirúrgico foi aplicado dose única de cloridrato de tramadol, 5 mg/kg, por via subcutânea. Os camundongos foram mantidos sobre platina aquecedora digital a 37°C até a recuperação da anestesia. Após duas semanas os machos foram colocados com fêmeas B6CBAF1 para testar a efetividade da vasectomia. Durante duas semanas as fêmeas foram observadas para detecção de possível gestação. Após o primeiro ano, os machos foram totalmente substituídos por outros 14 animais.

2.1.3 Diluição de hormônios e preparo do meio para manipulação de embriões

Os insumos utilizados foram os hormônios gonadotrofina sérica de égua prenhe (PMSG, Sigma) e gonadotrofina coriônica humana (hCG, Sigma), meio para manipulação de embriões (M2 sem HEPES, Sigma) e antibiótico penicilina-estreptomicina (Pen-Strep 100 x, Sigma). Os hormônios foram diluídos em solução tampão PBS estéril, 50 unidades internacionais (UI) /ml, foram feitas alíquotas de 1,0 ml e armazenadas em freezer -20°C. Ao meio M2, adicionou-se 500 µl de Pen-Strep para cada 50 ml de meio e filtros para seringa de 0,22 µm para filtragem. O meio foi armazenado em refrigerador entre 2-8°C.

2.1.4 Grupo das fêmeas doadoras de embriões

Foram submetidas à rederivação vinte linhagens de camundongos sem padrão sanitário definido, procedentes de diferentes instituições de ensino e pesquisa. Esses animais foram alojados no biotério de quarentena. A nomenclatura das linhagens encontra-se no quadro 1.

As linhagens foram rederivadas por solicitação do pesquisador responsável e algumas apresentavam “Material Transfer Agreement” (MTA), portanto para o uso a que se destinam era necessária prévia autorização. O biotério realizou a rederivação com a única finalidade de criar os animais com padrão sanitário definido.

Os acasalamentos foram realizados conforme a disponibilidade dos animais. No total foram acasaladas 160 fêmeas. Os procedimentos de administração de hormônios, acasalamento e retirada de ovidutos foram realizados por pessoal que não teve contato com o biotério SPF. As fêmeas foram superovuladas com a administração de cinco unidades internacionais (UI) por fêmea de gonadotropina sérica de égua prenhe entre 12:00 e 14:00. Após 48 horas aplicou-se cinco unidades internacionais (UI) de gonadotropina coriônica humana seguido do acasalamento ao acaso com machos da mesma linhagem ou com fundo genético igual. No 0,5 dia pós coito (d.p.c.) as fêmeas com tampão vaginal foram separadas em grupos de até cinco por gaiola.

Quadro 1 - Nomenclatura das linhagens de camundongos submetidas à rederivação

Nome comum da linhagem	Designação (internacional)
B6 BKO	B6.129S2- <i>Ighm</i> ^{tm1Cgn}
B6 CD11c-YFP	B6.Cg-Tg(Itgax-Venus)1Mnz
B6 OT II	B6.Cg-Tg(TcraTcrb)425Cbn
129 Sv PKR	129-Eif2ak2 ^{tm1Cwe}
B6 Dectin- 1	B6.129- <i>Clec7a</i> ^{tm1Gdb}
B6 PUMA	B6.129P2-Bbc3 ^{tm1Gpz}
B6 CD45.1	B6.SJL- <i>Ptprca Pepcb</i> /BoyJ
B6 ATG7RosaCreR	B6.TT2F-Atg7 ^{tm1(cre/ERT2)Tchi}
B6 Bim	B6.129-Bcl2l1 ^{tm1Boui}
B6 lpr	B6.MRL-Fas ^{lpr}
B6 TLR-4	B6.129-Tlr4 ^{tm1Aki}
B6 PAFR	B6.129P2-Ptafr ^{tm1Tksh}
B6 Galectina	B6.Cg-Lgals1 ^{tm1Rob} /J
B6 XPC	B6;129- <i>Xpc</i> ^{tm1Ecj} /J
B6 P2RX7	B6.129P2-P2rx7 ^{tm1Gab}
B6 Perforina	B6.129-pfn ^{tm1Clrk}
K 14-64/CSA	K 14-64/CSA
K 14-64 (+) /XPC (-/-)	K 14-64 (+) /XPC (-/-)
B6 Caspase 1	B6N.129S2- <i>Casp1</i> ^{tm1Flv} /J
B6 ASC 1	B6;129P2-Slc7a10 ^{tm1Dgen} /H

Fonte: (ANTIORIO, A. T. F. B., 2016).

2.1.5 Retirada de ovidutos e lavagem de embriões por “flushing

No 1,5 dia pós coito (d.p.c.) as fêmeas doadoras de embriões foram submetidas à eutanásia por deslocamento cervical. Em seguida, foi feita a assepsia do abdômen com álcool 70%, laparotomia e retirada dos ovidutos. Estes foram enviados ao biotério SPF, aonde foram colocados em placa de petri descartável e visualizados em estereomicroscópio (SMZ-10, Nikon). Os embriões foram coletados e lavados em pool por “flushing” dos ovidutos. Utilizou-

se agulha tamanho 30 G e seringa descartável de 2 ml. A ponta da agulha foi curvada a 90°, inserida na entrada do infundíbulo e o meio foi injetado sob pressão contínua. Após o “flushing”, os embriões foram coletados com micropipeta de vidro acoplada a um pipetador bucal de borracha. Realizou-se dez lavagens dos embriões com zona pelúcida intacta e sem materiais aderentes, a cada lavagem utilizou-se nova micropipeta estéril e o volume de cada banho foi diluído ao menos 100 vezes em relação ao precedente. A confecção das micropipetas e do pipetador bucal seguiu a literatura consultada (NAGY et al., 2003).

2.1.6 Grupo das fêmeas receptoras e transferência dos embriões

O grupo das receptoras foi formado por fêmeas, nulíparas, B6CBAF1 (híbrida), B.10A (isogênica) e CD1 (heterogênica), criadas no biotério do ICB/USP. Três dias e meio antes do acasalamento, as fêmeas foram expostas à maravalha suja das caixas dos machos vasectomizados para sincronização do ciclo estral. As fêmeas foram acasaladas com um macho vasectomizado cada uma, no período próximo ao final do ciclo claro. Com o acasalamento obteve-se fêmeas em pseudogestação (BRONSON; DAGG; SNELL, 1966). As transferências embrionárias foram realizadas 0,5 dia pós coito (d.p.c.) nas fêmeas com tampão vaginal. As transferências de embriões foram realizadas dentro da área limpa do biotério SPF em fluxo laminar horizontal (FUH-09, Veco). No total foram utilizadas 36 fêmeas. As fêmeas foram anestesiadas e mantidas aquecidas com igual metodologia utilizada para os machos vasectomizados. Cada fêmea foi posicionada em decúbito dorsal e realizada a tricotomia e assepsia com iodopovidona e álcool 70% da região entre a última costela e membros posteriores. Realizou-se uma incisão de 1,0 cm da pele próximo à coluna vertebral abaixo da última costela. A cavidade peritoneal foi acessada por incisão da musculatura acima da região dos ovários visualizados pela gordura peri ovariana. Utilizou-se estereomicroscópio (SMZ 2-B, Nikon) para visualização dos ovários e ovidutos. Após abertura da bolsa ovariana, uma micropipeta carregada com os embriões foi introduzida no infundíbulo. Cada fêmea recebeu de 10 a 30 embriões de duas células divididos entre os dois ovidutos. A sutura da pele foi realizada com fio de nylon 4-0, pontos simples separados. No total foram transferidos 625 embriões. Após três semanas, observamos os nascimentos e aos 21 dias de idade os filhotes foram desmamados. O resumo das etapas da rederivação está na figura 1 e no apêndice A estão as

imagens obtidas durante o período do experimento que serão enviadas à revista como material suplementar.

Figura 1 - Diagrama do programa de rederivação. As ações dos biotérios de quarentena e SPF ocorreram em paralelo por executores diferentes. Os dias foram representados no diagrama conforme a data da cópula (dia 0).

Fonte: (ANTIORIO, A. T. F. B., 2016).

2.1.7 Controles sanitário e genético

O controle sanitário foi realizado em três grupos: em animais sentinelas mantidos no biotério de quarentena antes da rederivação, em algumas fêmeas receptoras após o desmame dos filhotes e em animais sentinelas mantidos no biotério SPF. Os animais sentinelas foram expostos à maravalha suja das outras gaiolas por um período de doze semanas. A detecção de anticorpos foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA) para os seguintes agentes: vírus da hepatite murina (MHV), vírus minuto do camundongo (MVM), vírus de Theiler (TMEV), reovírus 3, ectromélie, vírus da pneumonia do camundongo (PVM), Sendai, parvovírus (MPV), coriomeningite linfocítica (LCMV), adenovírus (MAV), rotavírus (EDIM), norovírus (MNV) e *Mycoplasma* spp. Para detecção de bactérias foram coletados materiais biológicos dos tratos respiratório e digestório seguida da semeadura em meios de cultivo seletivos e não seletivos em condições de aerobiose e anaerobiose. A identificação das bactérias foi realizada através de kits para microrganismos Gram positivos e negativos. Realizou-se pesquisa para *Proteus mirabilis* a partir de lavado bronco alveolar e pool de fezes e identificação por meio de kits para enterobactérias. Para detecção de parasitas e protozoários foram utilizadas técnicas de microscopia direta para exame da pelagem e do conteúdo intestinal, esfregaço da mucosa e técnicas de concentração. A lista de agentes pesquisados seguiu as recomendações para o monitoramento para camundongos de laboratório da Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) (BERARD et al., 2014).

O controle genético foi realizado nos filhotes após o desmame, direcionado para a mutação específica de cada linhagem. O DNA foi extraído a partir de biópsias da ponta da cauda de cada um dos filhotes, seguida de sua amplificação em termociclador e identificação em gel de agarose.

2.1.8 Análise estatística

Utilizou-se one-way ANOVA (GraphPad Prism® Software) para avaliação das diferenças encontradas no resultado reprodutivo dos grupos das fêmeas receptoras.

2.2 RESULTADOS

2.2.1 Desempenho reprodutivo das linhagens

Foram submetidas 20 linhagens para rederivação, destas, em apenas duas não houve nascimento. Na tabela 1 estão apresentados os resultados reprodutivos e no gráfico 1, observa-se a média de embriões obtidos por fêmea por linhagem. Considerou-se a taxa de fertilidade como o número de embriões em duas células, em relação ao total examinado, ou seja, embriões em duas células, fragmentados e oócitos não fertilizados. A linhagem que apresentou maior taxa de fertilidade foi a B6 CD45.1 com 81% e a menor com 9% foi a K14-64(+) /XPC (-/-). Nota-se que em algumas linhagens, o número de embriões transferidos não corresponde com o total obtido, pois não havia fêmeas receptoras disponíveis. O número de nascidos vivos foi relacionado com o número de embriões transferidos por linhagem. Não houve nascimento nas linhagens B6 XPC e K14-64/CSA. Nasceram 148 filhotes vivos, destes, 65 machos e 75 fêmeas foram desmamados.

Tabela 1 - Resultados reprodutivos das linhagens de camundongos geneticamente modificados submetidas à rederivação embrionária.

Linhagem	Taxa de fertilidade	Transferência embrionária	
	Nº embriões duas células/ Total examinado (%)	Nº receptoras	Nº nascidos vivos/ Nº embriões transferidos (%)
B6 BKO (9)	62/121 (51)	2	17/40 (43)
B6 CD11c-YFP (5)	15/44 (34)	1	8/15 (53)
B6 OT II (5)	27/51 (53)	1	11/20 (55)
129 Sv PKR (5)	68/103 (66)	2	15/40 (38)
B6 PUMA (4)	9/14 (64)	1	6/9 (67)
B6 CD45.1 (3)	34/42 (81)	1	13/20 (65)
B6 ATG7RosaCreR (5)	29/54 (54)	1	8/20 (40)
B6 Bim (6)	48/118 (41)	2	12/40 (30)
B6 Dectin- 1 (4)	58/91 (64)	2	5/40 (13)
B6 lpr (7)	35/109 (32)	2	5/35 (14)
B6 PAFR (12)	123/245 (50)	3	3/60 (5)
B6 TLR-4 (3)	39/75 (52)	2	5/39 (13)
B6 Galectina (5)	66/95 (69)	1	5/20 (25)
B6 XPC (7)	33/67 (49)	2	0/33 (0)
B6 P2RX7 (3)	28/53 (53)	2	3/28 (11)
B6 Perforina (4)	34/44 (77)	2	10/34 (29)
K14-64/CSA (5)	53/89 (60)	3	0/53 (0)
K14-64(+)/XPC(-)(5)	7/77 (9)	1	3/7 (43)
B6 Caspase (5)	61/113 (54)	1	11/20 (55)
B6 ASC (5)	52/97 (54)	4	8/52 (15)

Fonte: (ANTIORIO, A. T. F. B., 2016).

Gráfico 1 - Média do total de embriões recuperados das fêmeas doadoras das diferentes linhagens de camundongos utilizadas para rederivação.

Fonte: (ANTIORIO, A. T. F. B., 2016).

O biotério buscou implantar a técnica de rederivação tendo como principal intuito a obtenção de animais com condições sanitárias definidas. Os dados foram obtidos da rotina, portanto não houve um grupo controle, dessa maneira, não foi realizado delineamento experimental prévio nem um estudo comparativo em relação aos resultados reprodutivos obtidos das diferentes linhagens de camundongos. Somente nas fêmeas receptoras foi possível avaliar as diferenças encontradas entre as linhagens. No gráfico 2, verifica-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre as fêmeas B6CBAF1 (animais híbridos) e as B10.A (linhagem isogênica), tanto para filhotes nascidos (A) como para desmamados (B).

Gráfico 2 - Comparação entre as diferentes linhagens de fêmeas receptoras e o número de filhotes nascidos (A) e desmamados (B)

Fonte: (ANTIORIO, A. T. F. B., 2016)

2.2.2 Controle Genético

Todos os filhotes apresentaram a mutação específica da linhagem em homozigose ou heterozigose, o que permitiu a partir destes, a formação de novos casais de fundação.

2.2.3 Controle Sanitário

Nos controles sanitários realizados antes do processo de rederivação nas sentinelas mantidas no biotério de quarentena, observou-se sorologia positiva em 37% dos animais para o vírus da hepatite murina (MHV) e 30% para norovírus (MNV). Alguns grupos de bactérias foram encontrados na orofaringe como, *Corynebacterium kutscheri* (5%), *Staphylococcus aureus* (42%), *Streptococcus* beta hemolítico (5%) e *Bordetella bronchiseptica* (5%). *Proteus mirabilis* foi encontrado em cultura de fezes em 5% dos animais testados. Em relação aos parasitas, detectou-se *Tritrichomonas minuta* (5%), *Tritrichomonas muris* (11%) e *Chilomastix bettencourti* (11%). Como estes animais foram mantidos na mesma sala do biotério de quarentena e o manejo era realizado sem o uso de fluxo laminar, considerou-se que todos os

animais foram potencialmente expostos aos agentes detectados nas sentinelas. Na tabela 2 estão os resultados do controle sanitário antes da rederivação. Nessa tabela foram listados somente os patógenos detectados.

Após o processo de rederivação, as fêmeas não apresentaram os agentes infecciosos previamente detectados nos animais da quarentena. Não foi testado norovírus, porém, este também não foi detectado em sentinelas posteriormente. Conforme recomendações da FELASA, realizamos o controle sanitário de sentinelas mantidas no biotério SPF. Detectou-se *Proteus mirabilis* em 9% dos animais. Na tabela 3, estão descritos os resultados dos controles sanitários após a rederivação.

Tabela 2 - Resultados dos controles sanitários realizados nos animais sentinelas mantidos no biotério de quarentena.

Patógenos específicos*	Amostra	Nº positivos/Nº testados (%)
Vírus		
Hepatite murina (MHV)	Soro	7/19 (37%)
Norovírus (MNV)	Soro	3/10 (30%)
Bactérias		
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	Orofaringe	1/19 (5%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Orofaringe	8/19 (42%)
<i>Streptococcus beta hemolítico</i>	Orofaringe	1/19 (5%)
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Orofaringe	1/19 (5%)
<i>Proteus mirabilis</i>	Orofaringe/ Intestinos/fezes	1/19 (5%) ¹⁾
Protozoários intestinais		
<i>Tritrichomonas minuta</i>	Intestinos/fezes	1/19 (5%)
<i>Tritrichomonas muris</i>	Intestinos/fezes	2/19 (11%)
<i>Chilomastix bettencourti</i>	Intestinos/fezes	2/19 (11%)

Fonte: (ANTIÓRIO, A. T. F. B., 2016).

Legenda: ¹⁾ Patógeno encontrado somente na cultura de fezes. *Outros agentes pesquisados da lista FELASA não foram detectados.

Tabela 3 - Resultados dos controles sanitários realizados nas fêmeas receptoras e sentinelas mantidas no biotério SPF após rederivação.

Patógenos específicos*	Amostras	Nº positivos/ Nº testados	Nº positivos/ Nº testados
		Fêmeas receptoras	Sentinelas
Vírus			
Hepatite murina (MHV)	Soro	0/12	0/10
Norovírus (MNV)	Soro	NT ¹⁾	0/10
Bactérias			
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	Orofaringe	0/14	0/11
<i>Staphylococcus aureus</i>	Orofaringe	0/14	0/11
<i>Streptococcus beta hemolítico</i>	Orofaringe	0/14	0/11
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Orofaringe	0/14	0/10
<i>Proteus mirabilis</i>	Orofaringe/ Intestinos/fezes	0/14	1/11 ²⁾
Protozoários intestinais			
<i>Tritrichomonas minuta</i>	Intestinos/fezes	0/14	0/10
<i>Tritrichomonas muris</i>	Intestinos/fezes	0/14	0/10
<i>Chilomastix bettencourti</i>	Intestinos/fezes	0/14	0/10

Fonte: (ANTIORIO, A. T. F. B., 2016).

Legenda: ¹⁾ NT: não testado. ²⁾ Patógeno encontrado somente na cultura de fezes. *Os animais apresentaram resultados negativos para os outros agentes recomendados pela FELASA.

2.3 DISCUSSÃO

A rederivação por transferência embrionária mostrou-se eficiente em eliminar os agentes infecciosos previamente encontrados nos animais mantidos na área de quarentena, dos quais os seguintes: vírus da hepatite murina (MHV), norovírus (MNV), *Corynebacterium kutscheri*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus beta hemolítico*, *Bordetella bronchiseptica*, *Tritrichomonas minuta*, *Tritrichomonas muris* e *Chilomastix bettencourti*. Os resultados obtidos na nossa prática podem ser comparados com o que vem sendo aplicado em outros

biotérios internacionais quanto à obtenção de animais de laboratório livres de patógenos específicos (VAN KEUREN; SAUNDERS, 2004; AMSTISLAVSKY et al., 2013).

Não houve detecção de anticorpos contra o vírus da hepatite murina (MHV) nas fêmeas receptoras após a rederivação, o que se assemelha aos dados encontrados na literatura (CARTHEW; WOOD; KIRBY, 1985). Em condições experimentais nas quais os embriões foram expostos ao vírus da hepatite murina, tanto as receptoras como os filhotes não apresentaram seroconversão após as lavagens e transferência dos embriões (MAHABIR et al., 2007). Em face do grande número de linhagens imunodeficientes que o biotério mantém, a presença do MHV promoveria a disseminação e infecção persistente do vírus na criação (REHG; BLACKMAN; TOTH, 2001). Além disso, infecções por MHV promovem numerosas alterações fisiológicas nos hospedeiros e compromete seriamente o valor desses animais na pesquisa (BAKER, 1998).

De acordo com nossos resultados, a transferência embrionária também evitou a introdução no biotério de animais infectados por norovírus. Este vírus é considerado endêmico em muitos biotérios e compromete principalmente camundongos com determinadas deficiências no sistema imune. Por ser encontrado em sêmen, oócitos e embriões, há o risco de transmissão do norovírus para a receptora e sua prole, entretanto, esse risco parece ser mínimo ou não existente (ZHANG, 2008; RASPA et al., 2016). Além da transferência de embriões, outros métodos para rederivação também se mostraram eficiente para eliminação do norovírus, o que corrobora com os nossos resultados (ARTWOHL; PURCELL; FORTMAN, 2008).

Há discussões quanto ao potencial de transmissão de alguns agentes infecciosos por embriões para as receptoras, especialmente alguns vírus que poderiam aderir ou mesmo penetrar a zona pelúcida, porém as infecções virais são pouco prováveis de acontecer em embriões com a zona pelúcida intacta. O embrião na fase de pré-implantação apresenta pelo menos quatro barreiras que o protege de viroses. A quebra dessas barreiras pode ocorrer nas seguintes situações: quando o vírus se encontra em altas concentrações no trato genital da fêmea, atravessando a zona pelúcida danificada pela infecção e atingindo a membrana celular, além disso, deve existir um receptor específico e por último o vírus deve ativar um mecanismo intracelular para replicar seu genoma e produzir proteínas virais. Segundo Van Soom et al. (2010) a transferência de embriões é a forma mais segura de transferência de material genético entre países. Para tanto, as medidas de biossegurança preconizadas pela International Embryo Technology Society (IETS) e pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) devem ser seguidas (STRINGFELLOW, 1998; STRINGFELLOW; GIVENS, 2000; OIE, 2016).

As barreiras sanitárias em um biotério livre de patógenos específicos vão além dos cuidados para o recebimento de animais, igualmente recomenda-se a prática de procedimentos operacionais padrão, como o uso de materiais e insumos livres de contaminantes e monitoramento periódico da sanidade dos animais. Utilizamos sentinelas para monitorar a criação e conforme mostram os resultados, o único agente encontrado foi o *Proteus mirabilis*. Esse microrganismo é considerado oportunista e o biotério monitora a presença deste, por manter em sua criação linhagens de camundongos imunodeficientes que poderiam ser afetadas (JONES; ESTES; JORDAN, 1972; MARONPOT; PETERSON, 1981; SCOTT, 1989). O *Proteus mirabilis* está presente na criação em baixos índices e eventualmente é identificado nos controles sanitários. Para sua eliminação seria necessário adquirir novas fêmeas receptoras livres de oportunistas e patógenos específicos (SOPF).

Devido ao crescente número de linhagens geneticamente modificadas de camundongos e por consequência o aumento do trânsito de animais entre biotérios, o uso de embriões seria uma alternativa mais segura e econômica para aquisição de novos modelos. Não apenas o status sanitário da linhagem, mas também o bem-estar dos animais seria preservado pois não haveria a necessidade do transporte de animais vivos. Além disso, o uso de embriões promoveria a redução do número de animais mantidos vivos somente para a manutenção das linhagens, pois estes podem ser criopreservados por tempo indeterminado (CRABBE et al., 1993; RALL et al., 2000; WAYSS; KLEFENZ; SCHENKEL, 2005; HAGN; MARSCHALL; HRABÉ DE ANGELIS, 2007; AMSTISLAVSKY et al., 2016).

Paralelo ao controle sanitário, realizou-se o controle genético dos filhotes, direcionado à mutação específica de cada linhagem, para seleção das matrizes para a futura expansão das linhagens recém introduzidas. O controle genético foi realizado a fim de se detectar possíveis falhas na técnica, como por exemplo, cruzamentos incorretos entre as linhagens. Outro ponto que eventualmente poderia ser questionado pelo pesquisador responsável, seria a perda ou alteração do fenótipo descrito em algumas linhagens mutantes após a rederivação. Segundo revisão feita por Franklin (2006) a manifestação da doença pode ser consideravelmente distinta em um camundongo geneticamente modificado e num animal isogênico ou heterogênico. Isso porque há alteração na susceptibilidade à agentes microbianos em decorrência da mutação induzida. Como resultado a infecção pode alterar o fenótipo de um camundongo mutante e confundir os resultados e conclusões sobre a função do gene alterado. Por exemplo, em estudos feitos com colite e doença neurodegenerativa, observaram-se alterações nos fenótipos após a rederivação. Os animais em ambiente com barreiras, não apresentaram os sinais das doenças manifestados em ambiente convencional. (CAPSONI; CARUCCI; CATTANEO, 2012;

LARMONIER et al., 2013). Informações genéticas corretas das linhagens mutantes recebidas são de fundamental importância, uma vez que podem existir vários mutantes para um mesmo gene. Observa-se que é comum a introdução de linhagens de camundongos em biotérios de criação com informações incompletas ou inexistentes e, nem sempre o controle genético é feito, provocando perdas aos biotérios e pesquisadores.

As taxas de fertilidade das fêmeas doadoras não foram uniformes e apresentaram variação. Por serem dados obtidos da rotina do biotério, não foi realizado estudo em um grupo controle e os animais eram utilizados conforme sua disponibilidade. Não foi possível realizar uma comparação entre as linhagens por apresentarem diferentes genótipos e características fenotípicas distintas. Linhagens que apresentaram baixa taxa de fertilidade, menos que 50%, como a B6 CD11c-YFP, B6 Bim e B6 lpr, mostraram também baixos índices de produtividade observados na criação. O índice de produtividade é obtido somando-se o total de filhotes desmamados na semana pelo número de fêmeas acasaladas. Nessas linhagens, observou-se produtividade entre 0,30 e 0,70, ou seja, cada fêmea desmamou entre 0,3 e 0,7 filhotes por semana. A linhagem B6 PUMA apresentou a menor produção de embriões, o que poderia ser explicado pelo índice de produtividade de 0,21 e intervalo entre partos maior que dois meses. Taxas de natalidade menores que 50% observadas em algumas linhagens poderiam ser limitantes para o resultado da rederivação, porém consideramos os resultados positivos, pois houve nascimentos de machos e fêmeas em 18 linhagens das 20 submetidas à técnica de rederivação. Somente nas linhagens B6 XPC e K14-64/CSA não houve nascimentos e não há dados disponíveis da criação para uma possível comparação. Há também a possibilidade de uma maior fragilidade dos embriões aos procedimentos de lavagem e manipulação.

Em estudo comparando-se linhagens transgênicas com seus pares selvagens, estes últimos apresentaram taxa de fertilidade maior que os transgênicos (VASUDEVAN; RABER; SZTEIN, 2010). Ademais, os eventos observados quanto à resposta individual de cada linhagem à superovulação hormonal e às taxas de nascimento, poderiam ser atribuídas às diferenças genéticas inerentes a cada linhagem, à idade e ao peso das fêmeas. (NAGY et al., 2003; BYERS; PAYSON; TAFT, 2006; LUO et al., 2011; BORTOLATTO et al., 2012).

As fêmeas receptoras foram avaliadas quanto à capacidade de levar a termo a gestação e cuidar da prole. Houve diferença significativa entre as fêmeas híbridas B6CBAF1 e a linhagem B10.A ($p < 0,05$). As fêmeas híbridas apresentaram melhores resultados quanto ao número de ninhadas nascidas e desmamadas enquanto que a B10.A apresentou baixos índices. Não houve diferença entre as fêmeas híbridas e as heterogênicas CD1. Esses resultados podem ser atribuídos ao vigor híbrido das fêmeas B6CBAF1 e a melhor capacidade reprodutiva de

animais heterogênicos. Optou-se por utilizar uma linhagem isogênica devido à disponibilidade dos animais, porém não alcançamos resultados positivos. Além disso, o tampão vaginal se desfazia com facilidade e nem sempre a fêmea com tampão vaginal apresentava alterações características ideais para receber os embriões, como sinais ovulatórios e ampola dilatada que permite melhor inserção da micropipeta no infundíbulo. A sincronização do ciclo estral foi realizada com a exposição da fêmea à maravalha suja dos machos, porém não foi feita a avaliação individual da fase do ciclo estral o que poderia aumentar o número de pseudogestações (WHITTEN, 1956; HEYKANTS; MAHABIR, 2016). Observou-se também resposta individual diversificada quanto à anestesia e analgesia. Em alguns animais, dentro da mesma linhagem, era necessário reaplicar o agente anestésico, pois não havia perda da sensibilidade com a dose inicial. Nesses casos a anestesia se aprofundava muito com o risco de perda dos animais. Dessa forma, consideramos substituir os agentes anestésicos injetáveis por fármacos inalatórios, considerados mais seguros. Não foram realizadas avaliações direcionadas para o controle da dor. O tramadol é considerado um potente opioide, porém com seu tempo de ação de poucas horas, seria mais adequado o uso de uma associação com um analgésico anti-inflamatório não esteroide (ZHANG et al., 2011; WOLFE et al., 2015). Em estudos que relacionaram o uso de analgésicos em receptoras, não houve alteração da taxa de sucesso das transferências embrionárias, portanto o uso de uma analgesia multimodal não seria um fator limitante para as transferências embrionárias e promoveria melhor controle da dor. (GOULDING et al., 2010; KOUTROLI et al., 2014).

Apesar da técnica ter um conceito simples e bem estabelecido, alguns pontos exigiram maior atenção durante sua implantação. A técnica envolveu habilidade do executor em microcirurgia com horas de prática e treinamento. Como a habilidade em microcirurgia pode ser considerado um fator limitante, alguns trabalhos fornecem alternativas com bons resultados, para a realização da transferência embrionária com o uso de pipetas modificadas ou metodologias diversificadas, como a transferência de embriões em estágio mais avançado (DAVIS, 1981; CHIN; WANG, 2001; ZHANG et al., 2009; SARVARI et al., 2013; CUI et al., 2014). Consideramos que a prática rotineira e o treinamento adequado contribuíram para a aquisição das habilidades necessárias para a realização da técnica cirúrgica.

Outras demandas encontradas durante a implantação do programa de rederivação foram: a necessidade de uma equipe treinada e coordenada, a disponibilidade de espaço físico para manutenção dos grupos de machos vasectomizados, fêmeas receptoras e doadoras, a disponibilidade de equipamentos adequados, inclusive de equipamento para congelar os embriões excedentes, disponibilização de insumos de qualidade e os custos para manter a

qualidade dos animais. Acrescenta-se também a premência em entregar ao pesquisador os animais em menor tempo possível (MAHABIR, 2010). Na nossa prática o tempo para a disponibilização dos animais para o pesquisador foi de seis meses a um ano.

2.4 CONCLUSÃO

A rederivação de linhagens de camundongos por transferência embrionária mostrou ser uma técnica eficiente tanto pelos resultados reprodutivos obtidos, como pelo status sanitário alcançado.

A padronização da sanidade da criação promove o refinamento na pesquisa e a redução no número de animais utilizados. No nosso entendimento a técnica é viável e com custo-benefício favorável. A melhora na condição sanitária dos camundongos permitiu a expansão destes em nossa colônia de criação e consequentemente a distribuição de melhores modelos experimentais para a comunidade científica.

REFERÊNCIAS

- AMSTISLAVSKY, S. Y.; BRUSENTSEV, E. Y.; ABRAMOVA, T. O.; RAGAEVA, D. S.; ROZHKOVA, I. N.; IGONINA, T. N.; KIZILOVA, E. A.; NAPRIMEROV, V. A.; FEOKTISTOVA, N. Y. Applying reproductive technologies and genome resource banking to laboratory animals. **Russian Journal of Genetics: applied research**, v. 6, n. 4, p. 373–377, 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1134/S2079059716040031>>. Acesso em: 30 out. 2016.
- AMSTISLAVSKY, S. Y.; IGONINA, T. N.; ROZHKOVA, I. N.; BRUSENTSEV, E. Y.; ROGOVAYA, A. A.; RAGAEVA, D. S.; NAPRIMEROV, V. A.; LITVINOVA, E.A.; PLYUSNINA, I. F.; MARKEL, A. L. Rederivation by embryo transfer in strains of laboratory mice and rats. **Russian Journal of Genetics: applied research**, v. 3, n. 4, p. 305–315, 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1134/S2079059713040023>>. Acesso em: 30 out. 2016.
- ARRAS, M.; AUTENRIED, P.; RETTICH, A.; SPAENI, D.; RÜLICHE, T. Optimization of intraperitoneal injection anesthesia in mice: drugs, dosages, adverse effects, and anesthesia depth. **Comparative Medicine**, v. 51, n. 5, p. 443–456, 2001.
- ARTWOHL, J. E.; PURCELL, J. E.; FORTMAN, J. D. The use of cross-foster rederivation to eliminate murine norovirus, *Helicobacter* spp., and murine hepatitis virus from a mouse colony. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS**, v. 47, n. 6, p. 19–24, 2008.
- BAKER, D. G. Natural pathogens of laboratory mice, rats, and rabbits and their effects on research. **Clinica Microbiology Reviews**, v. 11, n. 2, p. 231–266, 1998a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC106832/pdf/cm000231.pdf>>. Acesso em: 04 nov. 2016.
- BERARD, M.; FEINSTEIN, R.; GALLAGHER, A.; RASPA, M. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and. **Laboratory Animals**, v. 48, n. 3, p. 178–192, 2014.
- BESSELSSEN, D. G.; ROMERO-ALESHIRE, M. J.; MUNGER, S. J.; MARCUS, E. C.; HENDERSON, K. S.; WAGNER, A. M. Embryo transfer rederivation of C.B-17/Icr-Prkdc (scid) mice experimentally infected with mouse parvovirus 1. **Comparative Medicine**, v. 58, n. 4, p. 353–9, 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2706037&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 30 out. 2016.
- BORTOLATTO, J.; BOM, J.; MOTTA, M. C. da; CRUZ, R. J. da; FERREIRA, F. M.; SILVA, S. V. B. da; MASSIORINI, S.; CHAMMAS, R.; LIMA, R. D.; RUSSO, M. Núcleo

de desenvolvimento em fertilização in vitro. **Revista da Sociedade Brasileira da Ciência em Animais de Laboratório**, v. 1, n. 1, p. 14–23, 2012.

BRONSON, F. H.; DAGG, C. P.; SNELL, G. D. **Biology of the laboratory mouse**. 2nd. ed. New York: Dover Publications, New York, 1966. Disponível em: <<http://www.informatics.jax.org/greenbook/index.shtml>>. Acesso em: 04 nov. 2016.

BUITRAGO, S.; MARTIN, T. E.; TETENS-WOODRING, J.; BELICHA-VILLANUEVA, A.; WILDING, G. E. Safety and efficacy of various combinations of injectable anesthetics in BALB/c mice. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS**, v. 47, n. 1, p. 11–17, 2008.

BYERS, S. L.; PAYSON, S. J.; TAFT, R. A. Performance of ten inbred mouse strains following assisted reproductive technologies (ARTs). **Theriogenology**, v. 65, n. 9, p. 1716–1726, 2006.

CAPSONI, S.; CARUCCI, N. M.; CATTANEO, A. Pathogen free conditions slow the onset of neurodegeneration in a mouse model of nerve growth factor deprivation. **Journal of Alzheimer's disease: JAD**, v. 31, n. 1, p. 1–6, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22504318>>. Acesso em: 28 out. 2016.

CARTHEW, P.; WOOD, M. J.; KIRBY, C. Elimination of Sendai (parainfluenza type 1) virus infection from mice by embryo transfer. **Journals of Reproduction and Fertility**, v. 69, p. 253–257, 1983. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6310108>>. Acesso em: 28 out. 2016.

CARTHEW, P.; WOOD, M. J.; KIRBY, C. Pathogenicity of mouse hepatitis virus for preimplantation mouse embryos. **Journals of Reproduction and Fertility Ltd**, v. 73, p. 207–213, 1985. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2982018>>. Acesso em: 25 set. 2016.

CHIN, H. J.; WANG, C.-K. L. Utero-tubal transfer of mouse embryos. **Genesis**, v. 30, p. 77–81, 2001.

COMPTON, S. R. Prevention of Murine Norovirus Infection in Neonatal Mice by Fostering. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 47, p. 25–30, 2008.

CRABBE, J. C.; SCHNEIDER, U.; HALL, J. W.; MAZUR, P. Invited commentary: Cryopreservation as a tool for the study of selectively bred lines in rodent behavioral genetics. **Behavior Genetics**, v. 23, n. 4, p. 307–312, 1993.

CUI, L.; ZHANG, Z.; SUN, F.; DUAN, X.; WANG, M.; DI, K.; LI, X. Transcervical embryo transfer in mice. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS**, v. 53, n. 3, p. 228–31, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4128559&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 25 set. 2016.

DAVIS, T. Nonsurgical transfer of mouse embryos. **Bios**, v. 52, n. 3, p. 127–133, 1981.

FLECKNELL, P. **Laboratory animal anesthesia**. 3. ed. London: Academic Press, 2009.

FRANKLIN, C. L. Microbial considerations in genetically engineered mouse research. **ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources**, v. 47, n. 2, p. 141–55, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16547371>>. Acesso em: 25 set. 2016.

FRAY, M. D.; PICKARD, A. R.; HARRISON, M.; CHEESEMAN, M. T. Upgrading mouse health and welfare: direct benefits of a large-scale rederivation programme. **Laboratory Animals**, v. 42, p. 127–139, 2008.

GARY, J.; WRIGHT, W. Collection and Transfer of preimplantation embryos. **Biology of Reproduction**, v. 17, p. 453–458, 1977.

GLAGE, S.; DORSCH, M.; HEDRICH, H. J.; BLEICH, A. Rederivation of Helicobacter hepaticus-infected Mongolian gerbils by Caesarean section and cross-fostering to rats and mice. **Laboratory Animals**, v. 41, n. 1, p. 103–10, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17234056>>. Acesso em: 25 set. 2016.

GOULDING, D. R.; MYERS, P. H.; GOULDING, E. H.; BLANKENSHIP, T. L.; GRANT, M. F.; FORSYTHE, D. B. The effects of perioperative analgesia on litter size in Crl:CD1(ICR) mice undergoing embryo transfer. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS**, v. 49, n. 4, p. 423–426, 2010.

HAGN, M.; MARSCHALL, S.; HRABÉ DE ANGELIS, M. EMMA - The European mouse mutant archive. **Briefings in Functional Genomics and Proteomics**, v. 6, n. 3, p. 186–192, 2007.

HEYKANTS, M.; MAHABIR, E. Estrous cycle staging before mating led to increased efficiency in the production of pseudopregnant recipients without negatively affecting embryo transfer in mice. **Theriogenology**, v. 85, n. 5, p. 813–821, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.10.027>>. Acesso em: 01 set. 2016.

INZUNZA, J.; MIDTVEDT, T.; FARTOO, M.; NORIN, E.; OSTERLUND, E.; PERSSON, A.-K.; AHRLUND-RICHTER, L. Germfree status of mice obtained by embryo transfer in an isolator environment. **Laboratory Animals**, v. 39, n. 4, p. 421–7, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16197709>>. Acesso em: 01 set. 2016.

JONES, J. B.; ESTES, P. C.; JORDAN, A. E. *Proteus mirabilis* infection in a mouse colony. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 161, n. 6, p. 661–664, 1972.

KOUTROLI, E.; ALEXAKOS, P.; KAKAZANIS, Z.; SYMEON, I.; BALAFAS, E.; VOYIATZAKI, C.; KOSTOMITSOPOULOS, N. Effects of using the analgesic tramadol in mice undergoing embryo transfer surgery. **Lab Animal**, v. 43, n. 5, p. 167–72, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24751851>>. Acesso em: 01 set. 2016.

SUZUKI, L.; YOROZU, K.; WATANABE, T.; NAKURA, M. J. A. Rederivation of mice by means of in vitro fertilization and embryo transfer. **Experimental Animals**, v. 45, n. 1, p. 33–38, 1996.

LARMONIER, C. B.; LAUBITZ, D.; HILL, F. M.; SHEHAB, K. W.; LIPINSKI, L.; MIDURA-KIELA, M. T.; MCFADDEN, R.-M. T.; RAMALINGAM, R.; HASSAN, K. A.; GOLEBIEWSKI, M.; BESSELSSEN, D. G.; GHISHAN, F. K.; KIELA, P. R. Reduced colonic microbial diversity is associated with colitis in NHE3-deficient mice. **AJP: gastrointestinal and liver physiology**, v. 305, n. 10, p. G667–G677, 2013. Disponível em: <<http://ajpgi.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpgi.00189.2013>>. Acesso em: 01 set. 2016.

LUO, C.; ZUÑIGA, J.; EDISON, E.; PALLA, S.; DONG, W.; PARKER-THORNBURG, J. Superovulation Strategies for 6 Commonly Used Mouse Strains. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS**, v. 50, n. 4, p. 471–478, 2011.

MAHABIR, E. Rederivation of mouse colonies: challenges and strategies. **Transgenic Research**, v. 19, n. 2, p. 340, 2010.

MAHABIR, E.; BAUER, B.; SCHMIDT, J. Rodent and germplasm trafficking: risks of microbial contamination in a high-tech biomedical world. **ILAR Journal**, v. 49, n. 3, p. 347–3355, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18506068>. Acesso em: 01 set. 2016.

MAHABIR, E.; BULIAN, D.; NEEDHAM, J.; MAYER, A.; MATEUSEN, B.; SOOM, A. V.; NAUWYNCK, H.; SCHMIDT, J. Transmission of Mouse Minute Virus (MMV) but not Mouse Hepatitis Virus (MHV) Following Embryo Transfer with Experimentally Exposed In Vivo-Derived Embryos. **Biology of Reproduction**, v. 76, n. 2, p. 189–197, 2007. Disponível

em: <<http://www.biolreprod.org/cgi/doi/10.1095/biolreprod.106.056135>>. Acesso em: 01 set. 2016.

MARONPOT, R. R.; PETERSON, L. G. Spontaneous proteus nephritis among male C3H/HeJ mice. **Laboratory Animal Science**, v. 6, p. 697–700, 1981.

MORRELL, J. M. Techniques of embryo transfer and facility decontamination used to improve the health and welfare of transgenic mice. **Laboratory Animals**, v. 33, n. 3, p. 201–206, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10780837>. Acesso em: 30 out. 2016.

NAGY, A.; GERTSENSTEIN, M.; VINTERSTEN, K.; BEHRINGER, R. **Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003.

NICKLAS, W.; KEUBLER, L.; BLEICH, A. Maintaining and monitoring the defined microbiota status of gnotobiotic rodents. **ILAR Journal**, v. 56, n. 2, p. 241–249, 2015.

OIE. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. Collection and processing of laboratory rodent and rabbit embryos / ova. In: _____. **Terrestrial animal health code**. [S.l.] OIE - World Organization for Animal Health, 2016. cap. 4.10, p. 1–6. Disponível em: <<http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-code/access-online/>>. Acesso em: 04 nov. 2016.

RALL, W. F.; SCHMIDT, P. M.; LIN, X.; BROWN, S. S.; WARD, A. C.; HANSEN, C. T. Factors affecting the efficiency of embryo cryopreservation and rederivation of rat and mouse models. **ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources**, v. 41, n. 4, p. 221–7, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11123182>>. Acesso em: 30 out. 2016.

RASPA, M.; MAHABIR, E.; FRAY, M.; VOLLAND, R.; SCAVIZZI, F. Lack of transmission of murine norovirus to mice via in vitro fertilization, intracytoplasmic sperm injection, and ovary transplantation. **Theriogenology**, v. 86, n. 2, p. 579–588, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.02.008>>. Acesso em: 01 set. 2016.

REETZ, I. C.; WULLEMWEBER-SCHMIDT, M.; HEDRICH, H. Rederivation of inbred strains of mice by means of embryo transfer. **Laboratory Animal Science**, v. 38, n. 6, p. 696–701, 1988.

REHG, J. E.; BLACKMAN, M. A.; TOTH, L. A. Persistent transmission of mouse hepatitis virus by transgenic mice. **Comparative Medicine**, v. 51, n. 4, p. 369–374, 2001.

RUSSEL, W. M. S.; BURCH, R. L. **The principles of humane experimental technique**. London: Wheathampstead, 1959. Disponível em:
<http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane_exp/het-toc>. Acesso em: 30 out. 2016.

SARVARI, A.; NADERI, M. M.; SADEGHI, M. R.; AKHONDI, M. M. A technique for facile and precise transfer of mouse embryos. **Avicenna Journal of Medical Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 62-65, 2013.

SCOTT, R. Fatal *Proteus mirabilis* infection in a colony scid/bg immunodeficient mice. **Laboratory Animal Science**, v. 39, p. 470–471, 1989.

STEHR, M.; GREWELING, M. C.; TISCHER, S.; SINGH, M.; BLÖCKER, H.; MONNER, D. A; MÜLLER, W. Charles River altered Schaedler flora (CRASF) remained stable for four years in a mouse colony housed in individually ventilated cages. **Laboratory Animals**, v. 43, n. 4, p. 362–370, 2009.

STRINGFELLOW, D. A. Recommendations for the sanitary handling of in vivo derived embryos. In: STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. (Ed.). **Manual of the International Embryo Transfer Society**. Third Ed. Savoy, Illinois: IETS, 1998. p. 79–84.

STRINGFELLOW, D. A.; GIVENS, M. D. Preventing disease transmission through the transfer of in-vivo- derived bovine embryos. **Livestock Production Science**, v. 62, p. 237–251, 2000.

VAN KEUREN, M. L.; SAUNDERS, T. L. Rederivation of transgenic and gene-targeted mice by embryo transfer. **Transgenic Research**, v. 13, n. 4, p. 363–71, 2004. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15517995>>. Acesso em: 12 set. 2016.

VAN SOOM, A.; WRATHALL, A. E.; HERRLER, A.; NAUWYNCK, H. J. Is the zona pellucida an efficient barrier to viral infection? **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, p. 21–31, 2010.

VASUDEVAN, K.; RABER, J.; SZTEIN, J. Fertility comparison between wild type and transgenic mice by in vitro fertilization. **Transgenic Research**, v. 19, n. 4, p. 587–594, 2010.

WATSON, J.; THOMPSON, K. N.; FELDMAN, S. H. Successful Rederivation of Contaminated Immunocompetent Mice Using Neonatal Transfer with Iodine Immersion. **Comparative Medicine**, v. 55, n. 5, p. 465–469, 2005.

WAYSS, K.; KLEFENZ, M.; SCHENKEL, J. Cryopreservation of transgenic mouse embryos - An eight years' experience. **Journal of Experimental Animal Science**, v. 43, n. 2, p. 69–85, 2005.

WHITTEN, W. K. Modification of the oestrus cycle of the mouse by external stimuli associated with the male. **Journal of Endocrinology**, v. 13, p. 399–404, 1956.

WOLFE, A. M.; KENNEDY, L. H.; NA, J. J.; NEMZEK-HAMLIN, J. A. Efficacy of Tramadol as a Sole Analgesic for Postoperative Pain in Male and Female Mice. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 54, n. 4, p. 411–419, 2015.

ZHANG, L. **Microbial pathogen contamination in mouse gametes and embryos**. 2008. 92 f. Thesis (Master of Science) – University of Missouri, Columbia, 2008.

ZHANG, Y.; DU, L.; PAN, H.; LI, L.; SU, X. Enhanced analgesic effects of propacetamol and tramadol combination in rats and mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, n. 3, p. 349–353, 2011.

ZHANG, Z.; LV, X.; WANG, Y.; CHEN, Y.; ZHENG, R.; SUN, H.; BIAN, G.; XIAO, Y.; LI, Q.; YANG, Q.; AI, J.; DUAN, J.; TAN, R.; LIU, Y.; YANG, Y.; WEI, Y.; ZHOU, Q. Success of murine embryo transfer increased by a modified transfer pipette. **The Journal of reproduction and development**, v. 55, n. 1, p. 94–97, 2009.

APÊNDICE A

MATERIAL SUPLEMENTAR

Fotografias obtidas durante a realização do trabalho que serão enviadas como material suplementar para a revista.

Figura 1 - Retirada dos ovidutos após laparotomia [A], visualização macroscópica dos ovidutos [B], procedimento de “flushing” [C], pipetador bucal [D], coleta dos embriões [E] e visualização dos embriões – aumento 40x [F].

Fonte: (ANTIORIO, A. T. F. B., 2014).

Figura 2 - Fluxo horizontal, estereomicroscópio e placa aquecedora [A], instrumentos cirúrgicos utilizados para transferência de embriões [B], tricotomia da fêmea receptora [C], acesso cirúrgico para exposição do oviduto [D], exposição do ovário e oviduto esquerdos [E] e visualização do oviduto com auxílio do estereomicroscópio [F].

Fonte: (ANTIÓRIO, A. T. F. B., 2014).

Figura 3 - Materiais utilizados para vasectomia [A], exposição do ducto deferente para cauterização, [C] fêmea com tampão vaginal, [D] fêmea sem tampão vaginal, [E] fêmea B6CBAF1 receptora gestante e [F] fêmea CD1 receptora gestante.

Fonte: (ANTIORIO, A. T. F. B., 2014).

3 CONSIDERAÇÕES

A rederivação de linhagens de camundongos por transferência embrionária mostrou ser uma técnica eficiente tanto pelos resultados reprodutivos obtidos, como pelo status sanitário alcançado. A implantação da técnica possibilitou o recebimento seguro de 18 linhagens de camundongos geneticamente modificados na área de criação com barreiras. Eliminou vírus, bactérias e protozoários intestinais com a consequente melhora no bem-estar dos animais.

A padronização do status sanitário dos animais promove o refinamento na pesquisa e a redução no número de animais utilizados na pesquisa. Com a colaboração de uma equipe treinada e uso de insumos e equipamentos adequados, consideramos a transferência de embriões uma técnica para rederivação de linhagens de camundongos, viável e com custo-benefício favorável.

Por fim, a melhora na condição sanitária dos camundongos permitiu a expansão destes em nossa colônia de criação e consequentemente a distribuição de melhores modelos experimentais para a comunidade científica.

REFERÊNCIAS

BAKER, D. G. Natural Pathogens of Laboratory Mice, Rats, and Rabbits and Their Effects on Research. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 2, p. 231–266, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC106832/pdf/cm000231.pdf>>.

BESSELSSEN, D. G.; ROMERO-ALESHIRE, M. J.; MUNGER, S. J.; MARCUS, E. C.; HENDERSON, K. S.; WAGNER, A. M. Embryo transfer rederivation of C.B-17/Icr-Prkdc (scid) mice experimentally infected with mouse parvovirus 1. **Comparative Medicine**, v. 58, n. 4, p. 353–9, 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2706037&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 12 set. 2016.

CARTHEW, P.; WOOD, M. J.; KIRBY, C. Elimination of Sendai (parainfluenza type 1) virus infection from mice by embryo transfer. **Journals of Reproduction and Fertility Ltd**, v. 69, p. 253–257, 1983. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6310108>>. Acesso em: 30 out. 2016.

COMPTON, S. R. Prevention of murine norovirus infection in neonatal mice by fostering. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 47, p. 25–30, 2008.

DAVIS, T. Nonsurgical transfer of mouse embryos. **Bios**, v. 52, n. 3, p. 127–133, 1981.

FRAY, M. D.; PICKARD, A. R.; HARRISON, M.; CHEESEMAN, M. T. Upgrading mouse health and welfare: direct benefits of a large-scale rederivation programme. **Laboratory Animals**, v. 42, p. 127–139, 2008.

GARY, J.; WRIGHT, W. Collection and Transfer of preimplantation embryos. **Biology of Reproduction**, v. 17, p. 453–458, 1977.

GLAGE, S.; DORSCH, M.; HEDRICH, H. J.; BLEICH, A. Rederivation of Helicobacter hepaticus-infected Mongolian gerbils by Caesarean section and cross-fostering to rats and mice. **Laboratory Animals**, v. 41, n. 1, p. 103–110, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17234056>>. Acesso em: 30 out. 2016.

INZUNZA, J.; MIDTVEDT, T.; FARTOO, M.; NORIN, E.; OSTERLUND, E.; PERSSON, A.-K.; AHRLUND-RICHTER, L. Germfree status of mice obtained by embryo transfer in an isolator environment. **Laboratory Animals**, v. 39, n. 4, p. 421–7, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16197709>>. Acesso em: 01 nov. 2016.

SUZUKI, L.; YOROZU, K.; WATANABE, T.; NAKURA, M. J. A. Rederivation of mice by means of in vitro fertilization and embryo transfer. **Experimental Animals**, v. 45, n. 1, p. 33–38, 1996.

MAHABIR, E.; BAUER, B.; SCHMIDT, J. Rodent and germplasm trafficking: risks of microbial contamination in a high-tech biomedical world. **ILAR Journal**, v. 49, n. 3, p. 347–3355, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18506068>. Acesso em: 30 out. 2016.

MORRELL, J. M. Techniques of embryo transfer and facility decontamination used to improve the health and welfare of transgenic mice. **Laboratory Animals**, v. 33, n. 3, p. 201–206, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10780837>. Acesso em: 04 nov. 2016.

NICKLAS, W.; KEUBLER, L.; BLEICH, A. Maintaining and monitoring the defined microbiota status of gnotobiotic rodents. **ILAR Journal**, v. 56, n. 2, p. 241–249, 2015.

REETZ, I. C.; WULLEMWEBER-SCHMIDT, M.; HEDRICH, H. Rederivation of inbred strains of mice by means of embryo transfer. **Laboratory Animal Science**, v. 38, n. 6, p. 696–701, 1988.

RUSSEL, W. M. S.; BURCH, R. L. **The principles of humane experimental technique**. London: Wheathampstead, 1959. Disponível em: <http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane_exp/het-toc>. Acesso em: 30 out. 2016.

STEHR, M.; GREWELING, M. C.; TISCHER, S.; SINGH, M.; BLÖCKER, H.; MONNER, D. a; MÜLLER, W. Charles River altered Schaedler flora (CRASF) remained stable for four years in a mouse colony housed in individually ventilated cages. **Laboratory Animals**, v. 43, n. 4, p. 362–370, 2009.

VAN KEUREN, M. L.; SAUNDERS, T. L. Rederivation of transgenic and gene-targeted mice by embryo transfer. **Transgenic Research**, v. 13, n. 4, p. 363–71, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15517995>>. Acesso em: 01 set. 2016.

WATSON, J.; THOMPSON, K. N.; FELDMAN, S. H. Successful Rederivation of Contaminated Immunocompetent Mice Using Neonatal Transfer with Iodine Immersion. **Comparative Medicine**, v. 55, n. 5, p. 465–469, 2005.