



Biotécnicas reprodutivas na produção de animais geneticamente modificados para pesquisa biomédica

Reproductive technologies in biomedical research with the use of genetic modified laboratory animals

Marcel Frajblat^{1,3}, Vera Lucia Langaro Amaral²

¹Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

²Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Vale do Itajaí, UNIVALI, SC, Brasil.

³Correspondência: marcel@ccsdecania.ufrj.br

Resumo

Tecnologias reprodutivas têm uma participação fundamental na pesquisa biomédica. Por meio delas, novos modelos animais são produzidos e preservados de forma segura. A produção de animais geneticamente modificados envolve diretamente o uso de embriões, sua manipulação e transferência para fêmeas receptoras. Uma vez produzida uma nova linhagem geneticamente modificada, a melhor forma de preservá-la é por meio da criopreservação de espermatozoides ou embriões. Uma nova tecnologia para manipulação e modificação do genoma do camundongo foi desenvolvida nos últimos anos. O sistema CRISPR/Cas9 tornou a produção destes animais mais rápida, efetiva e com um custo mais baixo que as técnicas tradicionais. Esta tecnologia impulsionará o projeto mundial de produção de animais mutantes para cada um dos cerca de 25 mil genes presentes no camundongo. Ainda permitirá a produção de modelos com mutação dupla ou tripla e em animais com fundo genético distintos. Esta apresentação abordará a importância das técnicas reprodutivas neste processo fundamental da pesquisa biomédica.

Palavras-chave: camundongo, embrião, pesquisa biomédica, transgênico

Abstract

Reproductive technologies have a fundamental role in biomedical research. Through them, new animal models are produced and preserved safely. The production of genetically modified animals directly involves the use of embryos, their manipulation and transference to recipient females. Once a new genetically modified lineage has been produced, the best way to preserve it is by cryopreservation of sperm or embryos. A new technology for manipulating and modifying the mouse genome has been developed in recent years. The CRISPR / Cas9 system made the production of these animals faster, more effective and at a lower cost than traditional techniques. This technology will boost the worldwide mutant animal production project for each of the approximately 25,000 genes present in the mouse. It will also allow the production of models with double or triple mutation and in animals with different genetic backgrounds. This presentation will address the importance of reproductive techniques in this fundamental process of biomedical research.

Key words: mouse, embryo, biomedical research, transgenic.

Introdução

Animais de laboratório são modelos fundamentais em diversas áreas da pesquisa biomédica. Entre eles, o camundongo é o animal mais utilizado e está presente em cerca de 50% dos experimentos seguidos pelos ratos com cerca de 25%. Estas espécies são utilizadas como modelos animais para áreas de pesquisa como neurociências, genética, terapia celular, imunologia, farmacologia, embriologia, toxicologia entre diversas outras. São empregados também em testes de segurança no desenvolvimento de novos medicamentos e liberação de produtos que entram em contato com seres humanos.

É consenso na comunidade científica que para entender o sistema nervoso humano, a imunologia, o genoma entre outros sistemas, teremos que primeiro ser capazes de entendê-los no camundongo. No caso do genoma, é possível “desligar” cada um dos cerca de 25 mil genes um a um e gerar o que é chamado de animal mutante ou “knockout” (KO).

Um projeto mundial pretende produzir camundongos KO para cada um de seus genes. Esta é a melhor estratégia para entender a função de cada um destes genes. Em alguns casos será necessária a mutação de dois genes para a observar algum efeito no fenótipo. A mesma mutação também terá que ser repetida em animais de diferente fundo genético para observar sua relação com este (Doetschman, 2009). Atualmente já existem cerca de 15 mil linhagens de camundongos disponíveis para pesquisa e este número tende a crescer.

A produção destes animais e sua manutenção é totalmente dependente de biotécnicas reprodutivas. Os animais geneticamente modificados podem ser divididos em dois grupos: 1) animais transgênicos pela inserção



de um gene exógeno em seu genoma e 2) animais mutantes pela mutação induzida (Capecchi et al., 1989) ou espontânea de um de seus genes.

Para a produção destes animais é necessária a produção e manipulação de embriões, sendo que tradicionalmente duas técnicas são utilizadas nesta produção. Embriões no estágio pronuclear permitem que fragmentos exógenos de DNA sejam incorporados ao seu genoma e produzam fenótipo de acordo com o gene inserido (animais transgênicos). Células-tronco embrionárias são modificadas *in vitro* com a mutação de um de seus genes. Estas células são injetadas na blastocite de blastocistos receptores e são incorporadas a massa celular já presente. Estes embriões desenvolvem normalmente e geram animais denominados quimeras por serem formados por duas populações de células-tronco geneticamente diferentes (animais knockout ou com mutação definida).

Tecnologia CRISOER/Cas9

Uma nova metodologia de edição de genes de camundongo tem revolucionado esta área de ciência (Platt et al., 2014). O sistema CRISPR/Cas9 permite ao pesquisador uma ferramenta com menor custo e efetiva para modificação do genoma do camundongo. O sistema CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) permite a geração de novos modelos animais em genes alvo no estágio embrionário pronuclear substituindo o longo processo de modificação de células-tronco embrionárias e microinjeção em blastocite. Este sistema tem a mesma flexibilidade apresentada pela manipulação das células-tronco. Esta tecnologia tem transformado a etapa de manipulação genética extremamente mais rápida e acessível a muitos laboratórios. Porém, a etapa reprodutiva com a produção e micromanipulação de embriões continua necessária e essencial a produção destes animais.

Criopreservação

Outra tecnologia reprodutiva está envolvida na manutenção dos animais geneticamente modificados. A melhor estratégia para manter de forma segura esta quantidade de animais com diversidade genética é por meio da criopreservação de embriões e gametas (Davisson e Taft, 2006). Uma vez criopreservados, estes embriões e gametas conservam as características genéticas destes animais.

No caso de embriões, uma vez aquecidos, eles podem ser transferidos para fêmeas receptoras. Mas no caso de espermatozoides, a técnica mais eficiente é a fertilização *in vitro*, seguida pela transferência dos embriões para receptoras e o manejo reprodutivo dos filhotes. Esta apresentação abordará as técnicas reprodutivas mais utilizadas e a importância da reprodução animal no desenvolvimento e manutenção destes modelos fundamentais para a geração do conhecimento biomédico.

Considerações finais

As tecnologias reprodutivas têm uma presença assegurada no futuro da pesquisa biomédica com animais de laboratório. A produção de novos modelos animais em camundongo depende da produção de manipulação de embriões no estágio pronuclear. O sistema CRISPR tornou a edição do genoma do camundongo um processo acessível a boa parte dos laboratórios com equipamentos de biologia molecular. Mas são poucos os laboratórios que dominam as tecnologias de produção de embriões de camundongo em larga escala e sua micromanipulação e microinjeção dos vetores de modificação genética. O número cada vez crescente de novas linhagens exige uma estratégia para assegurar sua preservação e evitar sua perda. A criopreservação de espermatozoides e embriões de camundongo é a melhor estratégia para este fim. Portanto, a reprodução animal está intimamente ligada ao futuro da pesquisa biomédica.

Referências

- Capecchi MR.** Altering the genome by homologous recombination. *Science*, v.244, n.4910, p.1288-1292, 1989.
- Davisson MT, Taft RA.** Strategies for managing an ever increasing mutant mouse repository. *Brain Res*, v.1091, p.255-257, 2006.
- Doetschman, T.** Influence of Genetic Background on Genetically Engineered Mouse Phenotypes. v.530, p.423-433, 2009.
- Platt RJ, Chen S, Zhou Y, Yim MJ, Swiech L, Kempton HR, Dahlman JE, Parnas O, Eisenhaure TM, Jovanovic M, Graham DB, Jhunjhunwala S, Heidenreich M, Xavier RJ, Langer R, Anderson DG, Hacohen N, Regev A, Feng G, Sharp PA, Zhang F.** CRISPR-Cas9 Knockin Mice for Genome Editing and Cancer Modeling. *Cell*, v.159, p.440-455, 2014.