CRIAÇÃO DE CAMUNDONGOS "NUDE"

Vera Lucia PETRICEVICH*
Vera Regina Farago FERREIRA**
Monica de SOUSA***
Francisco Garcia de LANGLADA***

RESUMO: O presente trabalho teve como objetivo estabelecer normas de criação de camundongos "nude" da linhagem BALB/c, em alta escala, nas condições de nosso meio. Foram introduzidas as seguintes condições de nosso meio. Foram introduzidas as seguintes modificações nas normas gerais de criação: a) controle ambiental (temperatura entre 26 e 28°C, com renovação do ar interno a cada 3 horas, períodos alternados de 12 horas com luz e sem luz, utilização de mineral micáceo lamelar para a forragem das gaiolas; b) a alimentação foi suplementada com frutas e grãos; c) a amamentação dos filhotes foi de 35-40 dias e não 21 como usual até o desmame; d) o barulho nas salas de criação, foi minimizado através de treinamento especial de pessoal; e) a água foi esterilizada, acidificada e fornecida "ad libidum"; e f) controle permanente de infecções virais, principalmente, para o vírus hepatite murina tipo 3 (MHV3). Observou-se aumento significativo das taxas de natalidade e do número de filhotes que chegavam ao desmame. A mortalidade dos filhotes "nude", com 15 dias de idade, foi 40,3% e a taxa de mortalidade das fêmeas "nude" entre 31 a 210 dias de idade foi 54,3%. Em contraste, a mortalidade de machos, com a mesma idade, foi de 99%. A ausência de timo nos camundongos "nude", foi sempre monitorada por exames de animais de colônia escolhidos ao acaso.

UNITERMOS: camundongo "nude" (nu/nu), camundongo normal (Nu/nu), gene "nu".

* Laboratório de Imunoquímica
** Centro de Biotecnologia
*** Serviço de Fisiopatologia
Instituto Butantan, Caixa Postal 65 — CEP 01059-970
São Paulo — Brasil.
Recebido para publicação em 03.08.92 e aceito em 25.05.93.

INTRODUÇÃO

Os camundongos "nude" surgiram, pela primeira vez, no Virus Laboratory do Ruchill Hospital, em Glasgow, Escócia, em 1962⁷. A característica mais marcante dos camundongos "nude", independentemente da linhagem da qual se tenham originado, é a falta de pêlos no corpo, embora áreas esparsas com pêlos possam ser, ocasionalmente, observadas².

São pouco férteis, o que dificulta sua criação. Contudo, cruzando-se macho "nude" com fêmea heterozigota é possível obter uma prole constituída, em cerca de 50%, por camundongos "nude". Em geral, as fêmeas "nude" cruzadas com machos heterozigotos, têm poucos filhotes e estes são mais fracos que os camundongos normais. Além disso, elas não amamentam os filhotes. Uma outra característica descrita para estes animais é o curto período de vida. Flanagan², em 1966, verificou que nenhum destes animais sobrevive por um período maior que 25 semanas, sendo que 55% dos animais morrem com duas semanas de idade. O padrão de herança indica que o gene "nu" é um gene autossômico recessivo único².

Os camundongos "nude" não apresentam timo, em contraste com os camundongos heterozigotos, que apresentam timo normal¹². Apresentam extrema leucopenia, devida, principalmente, a uma linfopenia. Os camundongos "nude" devem ser mantidos isolados de outros animais, particularmente, outros camundongos. Em geral, os camundongos, convivem com algumas viroses e, possivelmente, outros germes patogênicos, os quais não são capazes de afetar a sobrevivência e o crescimento do animal. Portanto, em uma colônia de camundongos "nude" estes microorganismos podem causar doenças graves levando-os à morte⁴, sendo pois, indicado que estes animais sejam criados em condições especiais garantindo as características sanitárias dos animais e sua sobrevivência. Em especial, o camundongo "nude" é um instrumento útil para estudos do sistema imune.

O principal objetivo deste trabalho foi a produção de camundongos atímicos da linhagem BALB/c.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais:

Camundongos heterozigotos (Nu/nu) da linhagem BALB/c, oriundos da França, foram adquiridos pelo Serviço de Fisiopatologia do Instituto Butantan.

2. Ambiente:

As salas, onde a colônia foi mantida, possuíam uma área de 15m². A iluminação destas salas foi feita com lâmpadas fluorescentes, acesas durante 12 horas/dia. A temperatura da sala foi mantida a 27°C³, por instalação de aquecedores elétricos. A ventilação das salas foi realizada por exaustor do tipo "industrial". As gaiolas de aço inoxidável e de polipropileno, com dimensões de 30 x 20 x 12 cm, foram preparadas com camas constituídas por maravalha, algodão hidrófobo e mineral micáceo lamelar¹⁰, sendo que a limpeza das gaiolas constituiu-se trocas semanais. Todo material utilizado para as trocas foi esterilizado pelo calor.

3. Alimentação:

Durante todo o período de observação, a ração para camundongos teve a mes-

ma procedência (Nuvilab, Curitiba, Brasil). Além disso, durante o período de set./86 a Ago./87, a alimentação do plantel foi suplementada com aveia em grão, semente de girassol, quirera de milho, germe de trigo, cevada em grão, trigo em grão, soja texturizada, cenoura e frutas frescas (maçã, pêra, banana e coco). A água era filtrada e acidificada com ácido clorídrico, pH 2,5 2,8^{8,11}, e esterilizada.

4. Acasalamentos:

Foram realizados dois tipos de acasalamentos:

- Monogâmico (para cada macho "nude" uma fêmea heterozigota).
 - Heterogâmico (para cada macho heterozigoto, 3 - 4 fêmeas heterozigotas).
- Para os dois tipos de acasalamento foram escolhidas fêmeas e machos Nu/nu com 60 dias de idade, enquanto os camundongos "nude" tinham 75 dias de idade^(5,13). Através do método não-intensivo, após a verificação da prenhez, as fêmeas foram separadas dos machos.

5. Lactação:

Foi utilizado o método não-intensivo. Portanto, quando confirmada a prenhez das fêmeas Nu/nu, elas foram separadas dos machos e colocadas em caixas, aos pares⁹. Após o nascimento, os filhotes Nu/nu foram separados dos filhotes "nude". Desta forma, uma fêmea amamentava os filhotes heterozigotos, enquanto que a outra fêmea amamentava os filhotes atímicos.

6. Desmame:

Os filhotes heterozigotos foram desmamados com 21 dias de idade e os Nu/nu com 35 a 40 dias de idade.

7. Análise estatística:

Todos os animais existentes no plantel foram observados diariamente com anotações de natalidade e mortalidade. A análise estatística foi constituída dos seguintes indicadores:

$$\text{a) Taxa de natalidade} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de filhotes nascidos no mês}}{\text{n}^\circ \text{ de fêmeas acasaladas no mês}} \times 100$$

$$\text{b) Taxa de desmame} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de filhotes desmamados no mês}}{\text{n}^\circ \text{ de fêmeas acasaladas no mês}} \times 100$$

$$\text{c) Taxa de mortalidade} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de filhotes mortos}}{\text{n}^\circ \text{ de filhotes nascidos}} \times 100$$

$$\text{d) Porcentagem} = \frac{\text{número de óbitos}}{\text{n}^\circ \text{ total animais observados}} \times 100$$

8. Cálculo da probabilidade de diferenças:

A probabilidade, valor de "t" foi calculado:

$$t = \frac{(n_1 - n_2)}{\sqrt{e_1^2 + e_2^2}}$$

onde n_1 e n_2 representam as taxas analisadas e e_1 e e_2 correspondem ao erro padrão Poisson, o qual foi obtido através da Tabela III de Fisher e Yates¹.

9. Controle da infecção por MHV3

A infecção por vírus da hepatite murina provoca algumas doenças como hepatite, encefalite, pneumonite intersticial, nefrite e enterite, dependendo da linhagem e da idade do camundongo, da via de infecção e do tipo de MHV. Mensalmente, grupos de 10 camundongos foram sacrificados como controle de uma possível infecção por MHV3 na colônia.

10. Controle do barulho

O barulho nas salas, onde a colônia foi mantida, foi minimizado através de treinamento especial de pessoal.

RESULTADOS

A Tabela 1 apresenta os resultados de acasalamentos de camundongos (heterozigotos e "nude") nos períodos de Setembro/85 a Agosto/86 e de Setembro/86 a Agosto/87. Dos acasalamentos entre fêmeas Nu/nu e machos nu/nu, aproximadamente 50% dos filhotes são nu/nu, e 50% Nu/nu. De acasalamento entre fêmeas e machos heterozigotos, os filhotes que apresentavam pêlos foram separados e, em seguida, testados, para garantir a preservação do gene nu. Este teste constituiu-se em acasalamentos destes animais com camundongos atímicos. Os resultados destes testes mostraram que 25% dos animais apresentavam características Nu/Nu e 50 Nu/nu. todos os animais portadores do gene nu foram mantidos para substituição das matrizes, enquanto que os animais com genótipos Nu/Nu foram desprezados.

TABELA 1

Produção de camundongos "nude" no Biotério do Serviço de Fisiopatologia do Instituto Butantan.

PERÍODO	TOTAL DE ACASALAMENTOS		TOTAL DE NASCIMENTOS	NÚMERO DE FILHOTES		
				Nu/Nu	Nu/nu	Nu/nu
Set./85 a Ag./86	Nu/nu c/ Nu/nu	855	3.559	890	1.779	890
	Nu/nu c/ nu/nu	96		—	193	193
Set./86 a Ag./87	Nu/nu c/ Nu/nu	1.849	11.478	2.620	6.238	2.620
	Nu/nu c/nu/nu	911		—	3.948	3.948

Os resultados obtidos no primeiro período estudado, correspondente a Setembro/85 a Agosto/86, estão representados na Tabela 2. Durante este período foi possível observar um aumento da taxa de natalidade, principalmente entre os meses de Outubro/85, Fevereiro e Março/86. A maior taxa de desmame observada,

Tabela 2

Camundongos heterozigotos e "nude" segundo indicadores de produção e meses do período Set./85 a Ag./86

MÊS	NÚMERO DE FÊMEAS ACASALADAS	TOTAL DE FILHOTES NASCIDOS	TAXA DE NATALIDADE %	NÚMERO DE FILHOTES DESMAMADOS	TAXA DE DESMAME %	NÚMERO DE FILHOTES nu/nu MORTOS	TAXA DE MORTALIDADE DE FILHOTES "NUDE" %
Set./85	62	52	83,9	22	35,3	30	57,7
Out./85	27	213	788,9	—	—	43	20,2
Nov./85	41	111	270,7	—	—	10	9,0
Dez./85	21	61	290,5	17	81,0	14	22,9
Jan./86	42	200	476,2	9	21,4	7	3,5
Fev./86	31	244	787,1	3	9,7	50	20,5
Mar./86	31	215	693,3	34	109,7	87	40,5
Abr./86	77	329		55	71,4	40	12,2
Mai./86	132	622	471,2	46	34,8	173	27,8
Jun./86	95	296	311,6	46	48,4	116	39,2
Jul./86	180	444	246,7	34	18,9	200	45,0
Ago./86	242	1.159	478,9	50	20,7	190	16,4
Total	981	3.945		316		960	
Média/Mês	81,75	328,75	443,87	10,25	45,15	80,00	26,35

Tabela 3

Camundongos "nude" segundo os indicadores de produção e meses do período Set./86 a Ago./87

MÊS	NÚMERO DE FÊMEAS ACASALADAS	TOTAL DE FILHOTES NASCIDOS	TAXA DE NATALIDADE %	NÚMERO DE FILHOTES DESMAMADOS	TAXA DE DESMAME %	NÚMERO DE FILHOTES nu/nu MORTOS	TAXA DE MORTALIDADE DE FILHOTES "nude" %
Set./86	173	1.909	1.103,5	185	106,9	556	29,1
Out.86	118	1.486	1.259,3	161	136,4	346	23,3
Nov./86	111	781	703,6	177	159,5	318	40,7
Dez./86	100	886	886,0	128	128,0	334	37,7
Jan./87	339	1.379	406,8	585	172,6	325	23,5
Fev./87	150	1.712	1.141,3	176	117,3	396	23,1
Mar./87	228	987	432,9	490	214,9	350	35,5
Abr./87	312	2.270	727,6	525	168,3	337	14,8
Mai./87	350	1.882	537,7	968	276,6	315	16,7
Jun./87	545	1.968	361,1	332	60,9	301	15,3
Jul./87	342	2.407	703,8	538	157,3	301	12,5
Ag./87	263	1.707	649,0	749	284,8	284	16,6
Total	2.760	19374		5.014		4.163	
Média/Mês	252,58	1.614,5 ^(a)	772,71	200,41 ^(b)	165,29	346,9 ^(a)	24,06

a) significativamente diferente do período de Set./85 — Ago./86 $p = 0,001$.b) significativamente diferente do período de Set./85 — Ago./86 $p = 0,02$.

neste período, foi durante o mês de Março/86. As menores taxas de mortalidade dos filhotes para este período, foram observadas durante os meses de Novembro/85, Janeiro, Abril e Agosto/86.

A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos no decorrer do segundo período observado (Setembro/86 - Agosto/87). Com aplicação dos métodos de prolongar o período de lactação e o fornecimento de suplementos alimentares, foi possível obter um maior número de camundongos "nude" em idade de acasalamento. Conseqüentemente, para este período, observaram-se aumentos nas taxas de natalidade e desmame.

A longevidade dos camundongos "nude" está mostrada nas Tabelas 4 e 5. A Tabela 4 mostra que de 4.602 nascimentos, 2.562 (55,6%) atingiram a idade do desmame (35 - 40 dias de idade). Na Tabela 5, mostram-se as idades quando ocorreram os óbitos. A maior incidência de morte (40,3%) ocorreu nos 15 primeiros dias. O índice de mortalidade caiu com o avanço da idade.

Tabela 4
Estudo do tempo de vida de camundongos "nude".

ACASALAMENTOS	TOTAL DE FILHOTES NASCIDOS		FILHOTES "NUDE" DESMAMADOS	
	Nu/nu	nu/nu	MACHOS	FÊMEAS
1:1	4602	4602 ^a	1312 ^b	1250 ^b
1677 fêmeas Nu/nu c/macho nu/nu				

^a número de filhotes "nude" que foram observados.

^b número de camundongos "nude" que atingiram a idade de desmame.

Tabela 5
Mortalidade de filhotes "nude" entre 0 e 30 dias de idade.

FAIXA DE IDADE (EM DIAS)	MORTALIDADE Nº	PORCENTAGEM
0 — 5	872	18,9
6 — 10	720	15,6
11 — 15	268	5,8
16 — 20	121	2,6
21 — 25	31	0,7
26 — 30	28	0,6
TOTAL	2040	44,3

A Tabela 6 mostra a mortalidade de camundongos "nude" entre 31 e 210 dias de idade. Aproximadamente 42% das fêmeas e 72% dos machos morreram entre o 31º e o 90º dias de idade. Durante o período de 91 a 210 dias, a porcentagem de mortalidade encontrada foi de, aproximadamente, 12 e 26% para fêmeas e machos, respectivamente.

Para investigar a presença de MHV3 na colônia, grupos de camundongos "nude" eram sacrificados. Durante os dois períodos estudados, cerca de 10% destes animais apresentaram fígados com consistência flácida e áreas de tonalidade amarelada, entremeadas de áreas avermelhadas. Ao exame microscópico, os fígados apresentaram o parênquima hepático com sua citoarquitetura alterada por processo inflamatório, caracterizado por focos de necrose e degeneração celular, exsudato neutrófilo focal nas áreas necróticas, além de proliferação de células fagocitárias e infiltrado linfocitário característico de hepatite.

DISCUSSÃO

Este trabalho descreve os resultados obtidos na criação de camundongos "nude", nos períodos de set./85 — ag./86 e de set./86 — ag./87. Todos os fatores ambientais foram cuidadosamente controlados para a obtenção de melhores resultados quanto ao desenvolvimento e ao crescimento dos camundongos "nude". A utilização destes métodos, bastante simplificados, foi muito importante para a manutenção da colônia de camundongos "nude". No decorrer do segundo período estudado, foi possível observar aumentos significativos quanto ao número de nascimentos e ao número de filhotes desmamados. Vários fatores contribuíram para estes resultados:

1. Controle ambiental

a) Gaiolas

As gaiolas utilizadas para a criação dos camundongos "nude" foram de aço inoxidável e de polipropileno. Estas gaiolas foram trocadas 3 vezes por semana. A característica principal dos camundongos atímicos é a ausência de pêlos e, quando colocados em gaiolas com "cama" constituída por maravalha, foi observado ressecamento da pele e vários ferimentos ao longo do corpo dos animais. Estes problemas foram minimizados com a substituição por "cama" preparada com algodão hidrófobo, embora a taxa de mortalidade do plantel, principalmente filhotes, continuasse bastante elevada.

Na tentativa de diminuir a perda de filhotes, foi testado, ainda, um mineral micáceo lamelar, para o preparo das gaiolas. Com a utilização deste material, o qual é capaz de absorver umidade e odor, também foi possível observar uma redução de mortalidade dos filhotes, conseqüentemente, um aumento do número de animais desmamados.

b) Temperatura

A maioria das linhagens de camundongos é criada a uma temperatura entre 25 e 26°C. A temperatura ideal para a criação de camundongos "nude" é de 26 — 28°C³. Devido à falta de pêlos, o camundongo "nude" perde calor mais rapidamente que os camundongos normais. A temperatura da sala de criação foi mantida a 27°C, por instalação de aquecedores elétricos.

c) Ventilação

Os camundongos "nude" foram mantidos em salas do tipo sistema conven-

cional. Na tentativa de reduzir o nível de contaminantes atmosféricos ou microorganismos, através da instalação de exaustor do tipo "industrial", ligado a cada 3 horas.

d) Iluminação

Os períodos de iluminação e escuridão devem ser bem estabelecidos. Os animais atímicos devem ser mantidos em ambientes com ciclos de luz constantes. Lâmpadas fluorescentes foram instaladas em diferentes pontos da sala de criação, de modo a proporcionar a uniformidade da iluminação. Nas salas onde os camundongos atímicos foram criados, havia reostatos que permitiam acender e apagar gradualmente as luzes, simulando crepúsculo e amanhecer. Desta forma, procurou-se manter estes animais em condições mais semelhantes às naturais, evitando, assim, choques produzidos por escuridão ou iluminação bruscas. O período de iluminação para a criação de camundongo "nude" foi de doze horas, seguido por doze horas de escuridão.

2. Nutrição

a) Alimentação

Foi observado que as necessidades nutricionais dos camundongos "nude" são semelhantes às de camundongos normais. A ração utilizada foi especial para camundongos e de boa procedência, descrita em Materiais e Métodos. O desenvolvimento do camundongo "nude", quando comparado ao camundongo normal, é mais lento. Portanto, para tentar suprir esta deficiência, a alimentação foi suplementada como descrito em Materiais e Métodos. O peso corporal dos camundongos "nude", no momento do desmame, foi de 14g e 11g para machos e fêmeas, respectivamente. Em contraste, para os grupos de camundongos atímicos tratados com a alimentação suplementar, o peso encontrado foi 17g e 13g para machos e fêmeas, da mesma idade, possibilitando uma melhor seleção de matrizes.

b) Água

Ocasionalmente, na água, são encontrados baixos níveis de várias bactérias não patogênicas, incluindo *P. aeruginosa*. Para prevenir a contaminação da colônia de camundongo "nude", é recomendado que a água seja acidificada com adição de ácido clorídrico a um pH de 2,5 a 2,8^{6,8,11}. Na tentativa de eliminar a presença de alguns tipos de microorganismos prejudiciais a esses animais imunologicamente deficientes, o controle do pH da água foi muito importante para a manutenção da colônia.

3. Produção Animal

a) Acasalamentos, Lactação e Desmame

Vários tipos de sistemas de produção de animais são descritos^{3,10}. Os sistemas de acasalamentos utilizados neste trabalho estão descritos em Materiais e Métodos. Após a cobertura, as fêmeas foram separadas dos machos e colocadas duas por gaiola, no máximo. No momento do nascimento, todos os filhotes são muito semelhantes. Devido ao lento desenvolvimento do camundongo atímico, apenas após o 3º dia do nascimento é possível distingui-lo dos filhotes normais. Neste ponto, foi feita uma nova separação entre as fêmeas. Assim, uma das fêmeas amamentava apenas filhotes heterozigotos, enquanto a outra fêmea amamentava os filhotes atímicos. Esta separação de filhotes, durante o período de lactação, foi importante para proporcionar um crescimento mais rápido do camundongo imunologicamente mais fraco. Cerca de 40% dos filhotes "nude" mor-

reram durante os primeiros quinze dias de vida. Estes resultados são muito semelhantes aos de Flanagan², cuja mortalidade entre os filhotes nas duas primeiras semanas de vida foi 55%. Além disso, também foi verificado que o camundongo "nude" inicia sua alimentação sólida de 3 a 5 dias mais tarde quando comparado com camundongos normais.

Tabela 6

Mortalidade de fêmeas e machos "nude" entre 31 e 210 dias de idade.

DIAS DE VIDA	MORTALIDADE			
	FÊMEAS		MACHOS	
	Nº OBSERVADO	%	Nº OBSERVADO	%
31 — 50	85	6,8	107	8,2
51 — 70	284	22,7	358	27,3
71 — 90	159	12,7	488	37,2
91 — 110	95	7,6	160	12,2
111 — 130	33	2,6	71	5,4
131 — 150	14	1,1	65	4,9
151 — 170	8	0,6	34	2,6
171 — 190	1	0,08	9	0,7
191 — 210	4	0,3	6	0,5
TOTAL	683	54,3	1298	99,0

Em geral, os camundongos são desmamados com 21 dias de idade. Em contraste, os camundongos "nude" quando desmamados com esta idade não se desenvolvem mais, morrendo entre 5 — 10 dias após. Portanto, foi necessário aumentar o período de lactação (35 — 40 dias), o que tornou possível a obtenção de um maior número de camundongos da linhagem BALB/c. A mortalidade das fêmeas "nude" entre 31 e 210 dias de idade foi menor que a encontrada para os machos com a mesma idade.

4. Controle da infecção por MHV3

A grande maioria dos camundongos "nude" desenvolvem hepatite necrótica ocasionando sua morte². Flanagan², em 1966, sugeriu que as lesões encontradas no fígado destes animais resultaram de efeitos pleiotrópicos do gene "nu". Posteriormente, foi demonstrada a susceptibilidade de camundongos "nude" às infecções causadas por viroses murinas, especialmente MHV⁴. Durante os períodos estudados (set./85 — ag./86 e set./86 — ag./87), foi possível observar que dos 120 camundongos "nude" examinados 12 apresentaram infecção causada por MHV. Este vírus foi isolado a partir das lesões encontradas nos fígados

examinados e propagados "in vitro" em culturas de células L-929, dados que este trabalho não mostra.

Resultados semelhantes foram encontrados para o período de set./87 a ag./91, dados que este trabalho não mostra.

CONCLUSÕES

Durante o segundo período estudado os resultados obtidos quanto à produção de camundongos "nude" foram:

1. Aumento significativo do número de nascimentos e de filhotes desmamados.
2. Diminuição da taxa de mortalidade.
3. A mortalidade observada entre filhotes com duas semanas de idade foi de 40,3%.
4. A mortalidade de fêmeas e machos "nude" com 31 a 210 dias de idade foi de 54,3% e 99%, respectivamente.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Prof. Dr. Wilmar Dias da Silva (Chefe do Laboratório de Imunoquímica, Instituto Butantan) pelas críticas e sugestões no preparo deste manuscrito; Dra. C. Rosana Duarte Prisco (Serviço de Informática e Análise de Dados, Universidade de São Paulo) pela análise estatística da faixa etária.

ABSTRACT: The aim of the present work was to establish the parameters of breeding nude mice in our conditions. The following modifications of housing standard conditions, the care and the maintenance of the colonies were introduced: a) environmental control (temperature of 26-28°C, a regular diurnal lighting cycle, air renovation at each 3 hours and utilization of "mineral micáceo lamelar" used as bedding for animals; b) enrichment of the normal food with fresh fruits and grains; c) extension of the suckling period to 30 days; d) the noise inside the animal house was minimized by appropriate training of personnel; e) sterilized and acidified was administered "ad libidum" and f) the surveillance for the virus infection was permanent, specially for MHV3 virus. It was observed that under these conditions, the rates of birth survival and the weaning were significantly increased. The percentage of death of the offspring at the age of 15 days was 40.3%, whereas the female between 31-210 days, was 54.3%. In contrast, the male death at the same age was 99%. The absence of thymus in nude mice was monitored by examining animals at random selected.

KEYWORDS: Nude mice (nu/nu), normal mice (Nu/nu), "nu" gene.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FISHER, R.A., YATES, F. *Statistical methods for biological agricultural and medical workers*. London: Oliver & Boyd, 1943.
2. FLANAGAN, S.P. Nude a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Gent. Res.*, v.8, p. 295-309, 1966.

3. FOGH, J., GIOVANELLA, B. C. *The nude mouse in experimental and clinical research*. New York: Academic Press, 1978.
4. FUJIWARA, K., TAMURA, T., UEDA, K. Nude mice. In: INT. WORKSHOP, 2, 1976. *Proceedings ...* 1977. p. 53-60.
5. GIOVANELLA, B. C., STEHLIN, J. S. Heterotransplantation of human malignant tumors in "nude" thymus-less. I Breeding and maintenance of "nude" mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 51, p. 615-619, 1973.
6. INSTITUTE OF LABORATORY ANIMAL RESOURCES. *Guide for the care and use of laboratory animals*. Washington. DHEW Publ. n. (NIH) 74-23 Public Health Serv. Inst. Health, 1976.
7. ISAACSON, J.M., CATTANACH, B. M. Report mouse. *News Letter*, v. 27, p. 31-32, 1962.
8. LES, E.P. Effect of acidified-chlorinated water on reproduction in C3H/HeJ and C57BL/6J mice. *Lab. Anim. Care*, v. 18, p. 210-213, 1968.
9. LES, E.P. Cage population density and efficiency of feed utilization in inbred mice. *Lab. Anim. Care*, v. 18, p. 305-313, 1968.
10. MACHADO-SANTELLI, G. M., MORI, L. Avaliação preliminar do uso da vermiculita expandida na criação de animais de laboratório. *Ciênc. Cult.*, v. 38, p. 916-919, 1986.
11. MCPHERSON, C.W. Reduction of *Pseudomonas aeruginosa* and coliform bacteria in mouse drinking water following treatment with hydrochloric acid or chlorine. *Lab. Anim. Care*, v. 13, p. 737-744, 1963.
12. PANTELOURIS, E.M. Absence of thymus in a mouse mutant. *Nature*, v. 217, p. 370-371, 1968.
13. POILEY, S.M., OVEJERA, A.A., OTIS, A.P., REEDER, C.R. Nude mice. In: WORKSHOP NUDE MICE, 1, 1973. *Proceedings ...* p. 189-202.