

## MÉTODO PARA GERAÇÃO DE CAMUNDONGO DUPLO NOCAUTE PARA O GENE DA LEPTINA E RECEPTOR B1 DE CININAS

**RENATA ZANELLA<sup>1</sup>; POLIANA ESPÍNDOLA CORREIA<sup>2</sup>; EVELISE SAMPAIO DA SILVA<sup>2</sup>; THAIS MARTEN<sup>2</sup>; CARLOS CASTILHO DE BARROS<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>*Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos UFPel – rznutri@gmail.com*

<sup>2</sup>*Universidade Federal de Pelotas – espindola.poliana@gmail.com;*

*evelise\_sampaio@hotmail.com; thsmarten@hotmail.com*

<sup>3</sup>*Universidade Federal de Pelotas – barroscapel@gmail.com*

### 1. INTRODUÇÃO

A obesidade tem sido reconhecida como um fator de risco para patologias, tais como síndrome metabólica, distúrbios inflamatórios, doenças cardiovasculares (DCV) e diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (CASTRO et. al. 2014). Não apenas o excesso de gordura, mas sua distribuição corporal, especialmente nas regiões centrais (visceral ou intra-abdominal) está associado ao risco aumentado de desenvolver perturbações metabólicas e não metabólicas resultantes de um estado de resistência à insulina (RI) que é caracterizado, de acordo com Castro et al.(2014), pela diminuição da ação da insulina em tecidos alvos.

A descoberta da leptina, em 1994 (Zhang et al., 1994) como uma adipocina com função de regular a ingestão de alimentos, peso corporal e massa de gordura, contribuiu significativamente para o entendimento da obesidade como uma doença com um mecanismo molecular. A possibilidade de uma intervenção por vias moleculares do comportamento alimentar, bem como metabólicas e neuroendócrinas de regulação de nutrientes (DePaoli, 2014) passou a ser pesquisada desde então. Os níveis circulantes de leptina estão ligados à quantidade de tecido adiposo presente no organismo, sendo anorexígena a nível central além de ativar o gasto energético e a lipólise (Barros et al. 2009).

O camundongo deficiente para leptina (ob/ob) é uma importante ferramenta para estudos de obesidade, visto que produz uma leptina truncada, sem atividade biológica, conferindo ao animal uma obesidade hereditária severa, diabetes mellitus com resistência à insulina, entre outras anormalidades associadas (Barros et al., 2009). Os animais ob/ob são inférteis devido às alterações no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (HALUZIK et al., 2004), sendo necessário realizar o cruzamento destes com animais heterozigotos (ob/+) férteis para a geração de indivíduos obesos, o que torna a geração de um nocaute para o segundo gene caro e demorado, tanto pela geração de um maior número de animais como pela genotipagem prévia necessária pelo fenótipo idêntico de animais heterozigotos. O transplante de tecido adiposo de animais magros (+/+; ob/+) para seus irmãos obesos (ob/ob), já é uma técnica reconhecida como alternativa para a reversão do fenótipo de animais dos animais ob/ob (KLEBANOV, 2005) com perda de peso, melhora do perfil metabólico e restauração da fertilidade temporária por cerca de um ano (Barros et al., 2009).

Mori et. al. (2008) através de um estudo utilizando camundongos nocaute para BDKB1R e o modelo ob/ob, demonstrou que esses receptores participam na regulação do balanço energético através de um mecanismo que poderia envolver a modulação da sensibilidade à leptina. Além disso, outros experimentos mostraram que a deficiência do receptor B1 de cininas induziu anormalidades na homeostase de glicose e resistência à obesidade induzida por dieta hiperlipídica (Mori et al., 2008).

No presente estudo buscamos a geração de modelos biológicos transgênicos, duplo nocaute obB1RKO - deficientes tanto para o gene da leptina e quanto do receptor de cininas B1. Esses animais são importantes para possibilitar o estudo da relação deste receptor com a obesidade severa e suas comorbidades.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1 Animais

Os camundongos deficientes para os genes da leptina (ob/ob) e os nocaute para o receptor B1 de cininas (B1KO), da linhagem C57BL/6, foram obtidos a partir do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais (CEDEME) – UNIFESP. Os animais e seus controles estão mantidos no biotério do Laboratório de Nutrição Experimental da Faculdade de Nutrição da UFPel, em estantes ventiladas, com água e ração Nuvilab ® administrada *ad libitum*, sobre condições de temperatura e umidades controladas (20 + 2°C; 40-70%) e ciclo claro/escuro de 12/12h.

Para a identificação dos animais com os genótipos de interesse para o transplante, foi extraído o DNA genômico da cauda e realizada uma reação de PCR conforme descrita por Ellet et al.(2008).

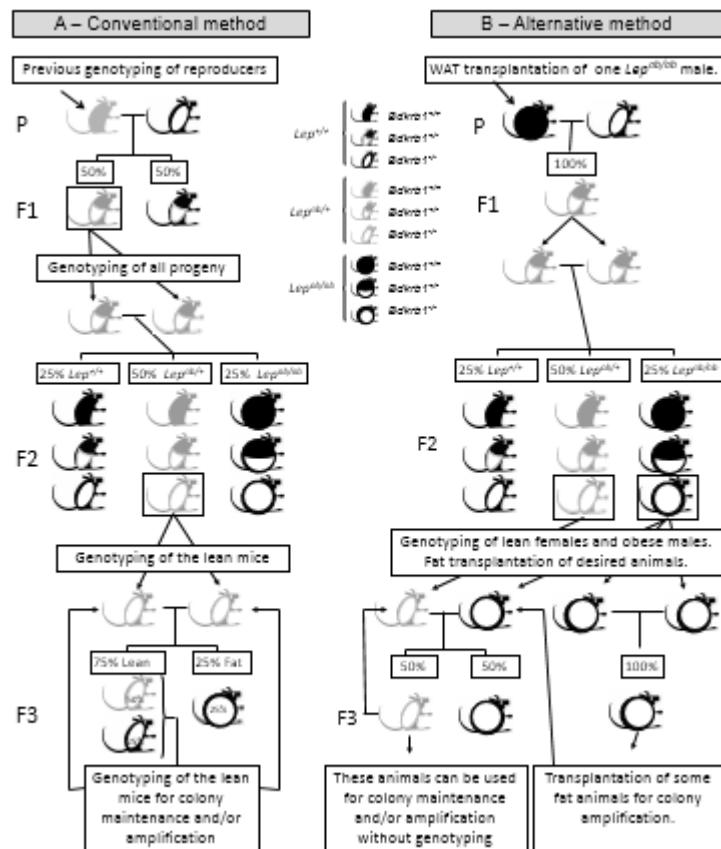
### 2.2 Transplante de Tecido Adiposo

Utilizou-se doadores, da mesma ninhada magros (OB/OB ou OB/ob), entre dois e três meses de idade, sendo sacrificados por deslocamento cervical e seu tecido adiposo removido e mantido sob condições estéreis. Após administração de anestesia geral, foram implantados 100-150 mg de fragmentos de tecido adiposo branco, distribuídos em duas pequenas incisões dorsais. Após cirurgia, foi administrado antibiótico para evitar infecção pós-cirúrgica.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o transplante, os animais apresentaram perda de peso progressiva alcançando um peso semelhante a um fenótipo magro em 4 semanas. A comprovação de sua fertilidade restaurada foi obtida através do cruzamento com fêmeas B1-/-, com monitoramento de prenhes e nascimentos. O resultado foi bem sucedido com a obtenção de 23 filhotes, com uma média de 8 animais por ninhada. Os filhotes foram desmamados com um mês de idade e seu genótipo confirmado apenas por observação do seu fenótipos, não sendo necessário a genotipagem dessa prole, uma vez que todos os animais homozigotos são obesos visíveis nessa idade.

Para o método convencional de geração de animais duplo nocaute (obB1RKO) o primeiro cruzamento foi realizado entre OB/ob e B1-/- (Figura 1a), e o produto (F1) deste cruzamento genotipado em relação ao gene Lep, sendo cruzados os animais heterozigotos duplos para obter a geração F2, que de acordo com as Leis de Mendel esses animais devem apresentar nove genótipos diferentes, onde 75% desses animais eram magros e tinham de ser genotipados para detectar os alelos do receptor B1 de cininas e do gene ob. Somente a parir do cruzamento de animais magros (OB/ob:B1-/-) obtém-se animais duplo nocaute, na proporção de 25% obesos e 75% de animais magros (B1:Ob/ob ou B1:OB/OB).



**Figura 1.** (a) Esquema do método convencional para a geração de camundongos obB1RKO. (b) Esquema do método alternativo para a geração de camundongos obB1RKO utilizando transplantes de tecido adiposo.

Conforme mostra a figura 2, comparando o método convencional anteriormente utilizado no nosso laboratório, com o método alternativo realizado a partir do transplante de TAB, a vantagem desse último torna-se mais evidente, demonstrando ser mais simples e rápido. Com redução tanto no número de animais a serem descartado pela seleção genética como nos passos necessário para obtenção do genótipo desejado.

#### 4. CONCLUSÕES

A distribuição de gordura corporal, mais do que a quantidade total de gordura, é relevante para avaliar o risco de desenvolver doenças metabólicas e não-metabólicas. Cada vez mais estudos buscam a compreensão das ligações entre a obesidade e suas comorbidades, portanto, a determinação de ferramentas eficazes e viáveis em termos de custo se faz ainda mais necessária. A técnica de transplante de tecido adiposo, estabelecida no Laboratório de Nutrição Experimental da Faculdade de Nutrição, da Universidade Federal de Pelotas, corresponde tais expectativas, podendo ser usada para obtenção tanto de animais duplo nocaute como animais obesos transgênicos com redução dos custos na produção e/ou manutenção das colônias.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARROS, C. C.; ALMEIDA, S. S.; MORI, M. A.; VALERO, V. B.; HARO, A. S.; BATISTA, E. C.; ROSA, T. S.; BACURAU, R. F.; WURTELE, M.; ARAUJO, R. C. Efficient method for obtaining Lep(ob)/Lep(ob)-derived animal models using adipose tissue transplantations. **International Journal of Obesity**, v. 33, n. 8, p. 938-44, 2009.
- CASTRO, A. B.; KOLKA, C. M.; KIM, S. P; BERGMAN, R. N.; Obesity, insulin resistance and comorbidities – Mechanisms of association. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 58, n.6, p. 600–609, 2014.
- MORI, M. A.; ARAUJO, R. C.; REIS, F. C.; SGAI, D. G.; FONSECA, R. G.; BARROS, C. C.; MERINO, V. F.; PASSADORE, M.; BARBOSA, A. M.; FERRARI, B.; CARAYON, P.; CASTRO, C. H.; SHIMUTA, S. I.; LUZ, J.; BASCANDS, J. L.; SCHANSTRA, J. P.; EVEN, P. C.; OLIVEIRA, S. M.; BADER, M.; PESQUERO, J. B. Kinin B1 receptor deficiency leads to leptin hypersensitivity and resistance to obesity. **American Diabetes Association**, v. 57, n. 6, p. 1491-500, 2008.
- DEPAOLI, A.M., Leptin in common obesity and associated disorders of metabolism. **Journal of Endocrinology**, California, 223, n. 1, p.71–81, 2014.
- HALUZIK, M.; COLOMBO, C.; GAVRILOVA, O.; CHUA, S.; WOLF, N.; CHEN, M.; STANNARD, B.; DIETZ, K.R.; LE ROITH, D., REITMAN, M.L.; Genetic background (C57BL/6J versus FVB/N) strongly influences the severity of diabetes and insulin resistance in ob/ob mice. **Journal of Endocrinology**, v.145, n.7, p. 3258–3264, 2004.
- ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M.; BARONE, M., LEOPOLD, L.; FRIEDMAN, J.M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, 372, p. 425–432, 1994.
- KLEBANOV, S.; ASTLE, C.M.; DESIMONE, O.; ABLAMUNITS, V.; HARRISON, D.E. Adipose tissue transplantation protects ob/ob mice from obesity, normalizes insulin sensitivity and restores fertility. **Journal of Endocrinology**, New York, 186, p. 203–211, 2005
- ELLET, JD; EVANS, ZP; ZHANG, G; CHAVIN. KD; SPYROPOULOS, DD. A Rapid PCR-based Method for the Identification of ob Mutant Mice. **The International Journal of Obesity**, v. 17, n. 2, p. 402–404, 2009.
- World Health Organization. **Obesity**. 03 jul. 2015. Acessado em 03 jul. 2015. Online. Disponível em: <http://www.who.int>