

REVERSÃO DA INFERTILIDADE EM CAMUNDONGOS C57BL/6 DEFICIENTES PARA O GENE DA LEPTINA (*ob/ob*) UTILIZANDO TRANSPLANTE DE TECIDO ADIPOSEO

POLIANA ESPÍNDOLA CORREIA¹; RENATA ZANELLA²; EVELISE SAMPAIO DA SILVA²; THAIS MARTEN²; CARLOS CASTILHO DE BARROS³

¹ Universidade Federal de Pelotas – espindola.poliana@gmail.com;

² Universidade Federal de Pelotas – rznutri@gmail.com;

thsmarten@hotmail.com; evelise_sampaio@hotmail.com;

³ Universidade Federal de Pelotas – barroscapel@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O aumento da obesidade e suas comorbidades se tornou um grande problema para o sistema de saúde pública em todo o mundo, especialmente no Brasil (WHO, 2005; BRASIL, 2006). Junto com o aumento da prevalência da obesidade temos consequentemente o aumento de doenças correlatas como dislipidemias, diabetes, síndrome metabólica e doenças cardiovasculares (BRASIL, 2006; MARQUES-LOPES et al, 2004).

Diversos modelos experimentais foram desenvolvidos para estudar a fisiopatologia da obesidade e de suas comorbidades (CESARETTI & KOHLMANN, 2006; KANASAKI & KOYA, 2011). Dentre os modelos experimentais utilizados, destaca-se o uso de animais deficientes em leptina. Esses animais possuem uma mutação de caráter autossômico recessivo no gene da leptina (*ob*), que dá origem a uma proteína truncada e sem função fisiológica. A leptina é um hormônio secretado principalmente pelo tecido adiposo, que age na regulação da ingestão alimentar, do metabolismo energético e de hormônios neuroendócrinos (NEGRÃO E LICINIO, 2000; HILZENDEGER, 2009). Animais deficientes para leptina (*ob/ob*) são hiperfágicos, letárgicos, resistentes a insulina, obesos mórbidos e inférteis (KLEBANOV et al, 2005; ELIAS & PUROHIT, 2012; QIU et al, 2001;), sendo excelentes modelos de estudo em obesidade e diabetes (QIU et al, 2001; KANASAKI & KOYA, 2011).

Contudo, devido a infertilidade desses animais, para se obter animais obesos (*ob/ob*), faz-se necessário o cruzamento de animais heterozigotos *ob/+*, portadores férteis da mutação do gene *ob*. Porém, os animais *ob/+* são fenotipicamente idênticos aos camundongos do tipo selvagem (WT - Wild Type) (ELLET et al, 2009), sendo necessária a genotipagem prévia desses animais. Esse método tradicional requer tempo e tem um alto custo. O transplante de tecido adiposo de animais magros (*+/+*; *ob/+*), em animais obesos (*ob/ob*), é no entanto uma alternativa na reversão do fenótipo de animais *ob/ob*, que têm, a partir desse método, sua fertilidade restaurada por pelo menos um ano (KLEBANOV, 2005; SENNELLO, 2006; BARROS, 2009). Tornando esse processo menos oneroso e mais eficaz.

O presente trabalho tem como objetivo reverter a infertilidade de camundongos *ob/ob* pelo transplante cirúrgico de tecido adiposo e amplificação da colônia desses animais para posterior uso em experimentos desta instituição.

2. METODOLOGIA

2.1. Modelos Biológicos

Foram obtidos oito camundongos (C57BL/6) *ob/+* do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME) da UNIFESP. Esses animais foram colocados em acasalamento, sendo eles e suas proles genotipados de acordo com o protocolo adaptado de ELLET et al (2009), sendo estes animais separados de acordo com o genótipo (*+/+*; *ob/+*; *ob/ob*). Os animais foram mantidos no Laboratório de Nutrição Experimental em estantes ventiladas, sob temperatura (22 +2°C) e umidade (40 – 60%) controladas, recebendo ração comercial padrão e água.

2.2. Transplante de Tecido Adiposo

Para o transplante, fragmentos de tecido adiposo branco (TAB; 100-150 mg cada) foram coletados de animais magros (*+/+*; *ob/+*), irmãos de mesma ninhada, e introduzidos em condições estéreis, por via subcutânea, em animais *ob/ob* machos anestesiados, por duas pequenas incisões cutâneas de 0,5mm, num total de oito transplantes cada. Os animais receberam medicação de antibióticos e analgésicos. Foram transplantados um total de 7 animais.

2.3. Amplificação da Colônia

Após o transplante os animais foram mantidos em gaiolas separadas até que estivessem totalmente recuperados da cirurgia. Passado esse período, esses animais foram colocados em acasalamento. Foram montados 7 haréns, cada um com 2 fêmeas heterozigotas (*ob/-*) em idade reprodutiva e um macho *ob/ob* transplantado. A fertilidade dos animais foi verificada através das ninhadas obtidas em cada harém.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na primeira semana após cirurgia os animais passaram a emagrecer progressivamente alcançando peso próximo ao normal após 4 semanas. A fertilidade desses animais foi reestabelecida, e após o cruzamento com fêmeas heterozigotas para o gene *ob*, foram obtidos 41 filhotes, uma média de 6 para cada animal transplantado. Quando atingiram um mês de idade, esses animais foram desmamados e os fenótipos observados.

De acordo com a lei da segregação independente de Mendel (GRIFFITHS, 2010), ao cruzar animais *ob/ob* x *OB/ob*, a seguinte variação genotípica é esperada: 50% dos animais *OB/ob* e 50% *ob/ob* (figura 3.b). Dessa forma não há necessidade de realizar a genotipagem da prole, uma vez que todos os animais homozigotos serão obesos no momento do desmame, como mostra a Figura 1.

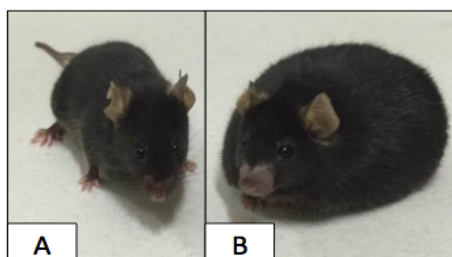


Figura 1. Diferenciação fenotípica dos animais. O animal A possui fenótipo compatível com *ob/+* e animal B compatibilidade com *ob/ob*.

Ao observar a prole obtida a partir dos cruzamentos, verificou-se que 64% dos animais eram *OB/ob* e 36% *ob/ob*. No entanto, o número de animais obesos deverá aumentar conforme ocorra o aumento do número de animais transplantados.

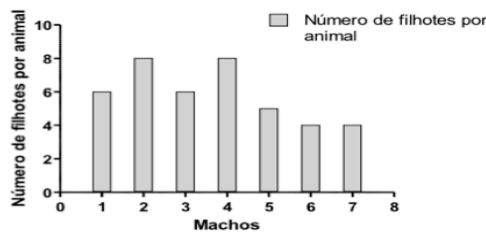


Figura 2. Número de filhotes obtidos a partir de cada animal após o transplante de TAB.

Quando comparado com o método convencional anteriormente utilizado no nosso laboratório, o cruzamento de animais heterozigotos, para obtenção de animais obesos, esse método mostrou-se mais simples e rápido, conforme mostra a figura 3.

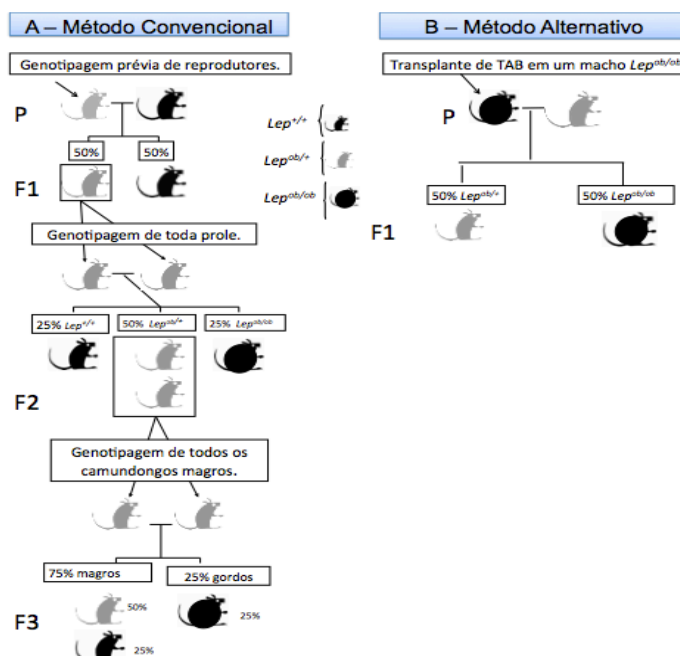


Figura 3. (a) Genótipos esperados em cruzamentos convencionais; (b) Genótipos esperados em cruzamentos com animais transplantados. Figuras cinzas representam os animais portadores heterozigotos para a mutação ob.

4. CONCLUSÕES

A técnica de transplante de tecido adiposo, está estabelecida no Laboratório de Nutrição Experimental da Faculdade de Nutrição, da Universidade Federal de Pelotas. Podendo ser usada para obtenção de animais obesos transgênicos com redução dos custos na produção e manutenção das colônias destes animais. Reduzindo desta forma o número de caixas necessárias, de animais a serem eliminados e abolindo totalmente a necessidade de genotipagem dos animais magros, uma vez que todos os magros gerados serão sempre portadores da mutação. Constituindo assim, uma importante ferramenta no estudo da obesidade e suas comorbidades.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Preventing chronic diseases: a vital investment. Geneva; 2005.

BRASIL. Obesidade- Cadernos de Atenção Básica nº12. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica; 2006.

MARQUES-LOPES, I; MARTI, A; MORENO-ALIAGA, MJ; MARTÍNEZ, A. Aspectos genéticos da obesidade. **Revista de Nutrição**, Campinas. v. 17, n. 3, p. 327-338, set. 2004.

CESARETTI, MLR; KOHLMANN JUNIOR, O. Modelos experimentais de resistência à insulina e obesidade: lições aprendidas. **Arquivo Brasileiro Endocrinologia & Metabologia**, São Paulo , v. 50, n. 2, p. 190-197, abr. 2006.

KANASAKI, K; KOYA, D. Biology of Obesity: Lessons from Animal Models of Obesity. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, Article ID 197636, 11 pages, 2011.

NEGRÃO, AB; LICINIO, J. Leptina: o Diálogo entre Adipócitos e Neurônios. **Arquivo Brasileiro Endocrinologia & Metabologia**, São Paulo , v. 44, n. 3, p. 205-214, June 2000.

KLEBANOV, S.; ASTLE, CM; DESIMONE, O; ABLAMUNITZ, V; HARRISON, DE. Adipose tissue transplantation protects ob/ob mice from obesity, normalizes insulin sensitivity and restores fertility. **Journal of Endocrinology**, v. 186: p. 203–211, 2009.

ELIAS, CF; PUROHIT, D. Leptin signaling and circuits in puberty and fertility. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 70, p. 841-862, 2013.

QIU, J; OGUS, S; MOUNZIH, K; EWART-TOLAND, A; CHEHAB, FF. Leptin-Deficient Mice Backcrossed to the BALB/cJ Genetic Background Have Reduced Adiposity, Enhanced Fertility, Normal Body Temperature, and Severe Diabetes. **Endocrinology**, v. 142, n. 8, p. 3421–3425, 2001.

ELLET, JD; EVANS, ZP; ZHANG, G; CHAVIN, KD; SPYROPOULOS, DD. A Rapid PCR-based Method for the Identification of ob Mutant Mice. **Obesity**, v. 17, n. 2, p. 402–404 , 2009.

SENNELLO, JA; FAYAD, R; PINI, M; GOVE, ME; FANTUZZI, G; Transplantation of wild-type white adipose tissue normalizes metabolic, immune and inflammatory alterations in leptin deficient ob/ob mice. **Cytokine**; v. 36, p. 261–266, 2006.

BARROS, CC, ALMEIDA, SS, MORI, MA *et al.* Efficient method for obtaining Lep(ob)/Lep(ob)-derived animal models using adipose tissue transplantations. **International Journal of Obesity**, v. 33, p. 938–944, 2009.

GRIFFITHS, AJF; WESSLER, SR; LEWONTIN, RC; CARROL, SB. **An Introduction to Genetic Analysis**. 10th Edition. W. H Freeman, New York, 2010.