

O USO DE TRANSPLANTE DE TECIDO ADIPOSO PARA FACILITAR O RETROCRUZAMENTO E A MANUTENÇÃO DE ANIMAIS GENETICAMENTE MODIFICADOS MODELOS DE OBESIDADE

GISELE DA SILVA DIAS¹; CARLOS CASTILHO DE BARROS²

¹*Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) – giselediasss4@gmail.com*

²*Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) – barrosccpel@gmail.com*

1. INTRODUÇÃO

A prevalência da obesidade tem crescido rapidamente e representa um dos principais desafios de saúde pública neste início de século (COUTINHO et al, 2007).

Existem diversos modelos para o estudo da obesidade, dentre eles os modelos animais, sendo os camundongos os mais utilizados nas pesquisas por apresentarem uma base genética muito semelhante à do humano e por serem fáceis de manipular e de criar. Além de estudos que apresentam os aspectos ambientais que impactam na condição em questão, o estudo das bases genéticas que levam a sua pré-disposição tem se mostrado em evidência (SPEAKMAN et al, 2008). Os modelos de obesidade que possuem mutações no gene do hormônio da saciedade leptina (ob/ob) são os mais estudados (PERRY et al, 1994). Camundongos cujo apresentam esta mutação são hiperfágicos e desenvolvem obesidade logo após o desmame. Eles desenvolvem também forte resistência à insulina, baixo gasto energético e infertilidade (CHARLTON, 1984).

Existem animais deficientes tanto para a leptina como para o receptor B1 de cininas (ob/obB1^{-/-}) (PESQUERO et al, 2000). A deficiência do receptor B1 de cininas, por sua vez, conta com maior sensibilidade à leptina, maior gasto energético e maior oxidação lipídiaca, logo, ao contrário dos camundongos ob/ob, este genótipo apresenta proteção contra o ganho de peso (MORI et al, 2008).

Objetivando evitar diversos tipos de vieses que podem resultar de um estudo, muitos autores têm adquirido seus dados utilizando camundongos isogênicos para todos os genes, os quais fornecem um ponto de integração entre os dados a serem estudados. O termo isogênico é usado na descrição do status genotípico de um locus em que todos os indivíduos de uma geração consanguínea são homozigotos para o mesmo alelo, o qual tornou-se geneticamente fixo e, portanto, invariável, exceto por mutação (BAILEY, 1982). O retrocruzamento entre animais da mesma família é uma poderosa ferramenta para o controle da isogenicidade. Desse modo, o objetivo desse trabalho foi criar um método eficiente para fazer o retrocruzamento e manutenção dos modelos de camundongos deficientes para leptina e outros genes concomitantemente.

2. METODOLOGIA

Animais

Foram utilizados camundongos ob/ob no fundo genético C57BL/6, adiante chamados somente de obWT, e camundongos B1^{-/-}, posteriormente chamados de B1, mantidos no Biotério de Nutrição Experimental da Faculdade de Nutrição (UFPEL) – Campus Anglo, em estantes ventiladas, com água e ração comercial *ad libitum*, temperatura de 21±2°C e ciclo de 12 horas de luz/12 horas de escuro. Este estudo foi conduzido em conformidade com o Comitê de Ética da UFPEL.

Transplante de tecido adiposo

Foi desenvolvida a técnica de transplante de tecido adiposo para restaurar a fertilidade dos camundongos ob/ob, posteriormente destinados ao retrocruzamento. Para tal, os camundongos ob/ob receberam o tecido adiposo epididimal (TAE) retirado de irmãos magros de mesmo gênero, os quais foram sacrificados por deslocamento cervical. O TAE foi retirado em condições estéreis e colocado em solução salina tamponada (PBS). Os animais ob/ob foram anestesiados com xilazina e a ketamina nas doses de 10 e 150 mg por kg, respectivamente. Foram implantados 1000 mg de tecido em cada animal, divididos em 8 fragmentos de 100 a 150 mg, inseridos no subcutâneo através de duas pequenas incisões (5 mm) com sentido crânio caudal, seguindo a linha média dorsal, sendo uma sobre o tórax e outra sobre a região lombar. A solução de continuidade da pele foi reduzida com pontos simples feitos com fio cirúrgico de polipropileno número 4-0. Após cirurgia, foi administrado antibiótico (benzilpenicilina, 100.000UI/kg) e antiinflamatório (Butorphanol 5 mg / kg a cada 6 h), via subcutânea, para evitar infecção pós-cirúrgica e reduzir o desconforto dos animais. Os animais foram monitorados diariamente e o acompanhamento da variação da massa corporal foi realizado semanalmente. Após três semanas de recuperação os animais foram colocados com fêmeas magras B1.

Genotipagem do gene OB

A genotipagem do gene OB foi realizada através da técnica de PCR ao início do processo visando garantir os cruzamentos adequados e a manutenção dos genótipos estudados. Uma amostra de cerca de 0,5 cm da extremidade da cauda do camundongo foi incubada à 55°C overnight com 100µL de tampão de lise (EAR Buffer) e 5µL proteinase K; ao final da digestão foi adicionado 750µL TE Buffer. O DNA extraído foi submetido à PCR e o produto da reação foi visualizado em gel de agarose 2% corado com SYBR Safe. Foram utilizados três primers, sendo estes RFPL-F, RFPL-R e Lepob-R, que possibilitam a amplificação de dois fragmentos: 191pb e 123pb (ELLET et al, 2008).

Genotipagem do gene B1

Também com a finalidade de garantir os cruzamentos adequados e a manutenção dos genótipos estudados, foram realizadas regularmente genotipagens com o propósito de identificar camundongos B1. Foi utilizado o mesmo protocolo da técnica de PCR, entretanto, com diferencial nos primers usados, sendo estes quatro primers (IMR013, IMR014, IMR434 e IMR435) que permitem a visualização de 2 fragmentos, sendo estes 280 pb e 361 pb.

Proposta de retrocruzamento

A proposta de retrocruzamento foi planejada visando executar o modo mais eficiente para a geração de colônias isogênicas. O primeiro cruzamento do processo foi realizado com um macho ob/ob transplantado e uma fêmea B1 homozigota sem mutação. Não houve necessidade de qualquer genotipagem para a prole deste casal, tendo em vista que ambos filhotes são duplo heterozigotos. Destes, as fêmeas foram destinadas ao cruzamento com o macho usado no primeiro momento, e os machos não foram utilizados. Os filhotes gerados desse cruzamento serão sempre 50% obesos e 50% magros, logo, sabe-se o genótipo destes animais quanto ao gene da leptina, pois os animais obesos são homozigotos para a mutação e os magros são heterozigotos. Por outro lado, é necessária a genotipagem para o gene B1, pois só permanece no processo machos que não possuem a mutação e fêmeas heterozigotas. As fêmeas obesas

não foram utilizadas. Os machos magros podem ser destinados a doação de tecido adiposo para os machos obesos, caso estes necessitem entrar no processo de cruzamento. Caso contrário, tanto os animais magros quanto os obesos não são utilizados. A partir daí, na próxima etapa há o cruzamento entre as fêmeas magras e os machos da mesma prole transplantados ou entre o macho utilizado no primeiro momento, caso este ainda esteja vivo e fértil. Neste estudo as fêmeas foram cruzadas com o macho usado na primeira etapa. A quarta e demais etapas feitas serão sempre iguais a terceira. É válido ressaltar que a isogenicidade é atingida somente a partir da oitava etapa, que foi o número de etapas realizadas neste estudo.

Para montar a maternidade de animais B1 puros, os animais heterozigotos resultantes da última geração foram cruzados entre si, tendo em vista que a falta de animais homozigotos não possibilitou a formação da maternidade em primeiro momento. Desse cruzamento, 50% dos animais eram obesos, ou seja, com a mutação no gene da leptina, e 50% dos animais eram magros, ou seja, heterozigotos para tal mutação. As fêmeas obesas não foram utilizadas. Os machos magros foram destinados a doar tecido adiposo para os machos gordos, os quais necessitaram de genotipagem para o gene B1 antes do processo, assim como as fêmeas magras, tendo em vista que somente animais sem a mutação no receptor B1 de cininas foram selecionados. A prole deste casal resultou nos animais experimentais B1, sendo 50% obesos e 50% magros, os quais respectivamente possuíam e eram heterozigotos para a mutação no gene da leptina. Entretanto, como foram usados somente animais sem a mutação no receptor B1, 100% dos filhotes gerados não possuem essa mutação.

Já para formar a maternidade de WT puros, devido a disponibilidade de animais homozigotos sem a mutação no receptor B1 de cinias resultantes da última etapa de cruzamento, foi necessário somente a genotipagem destes animais para o gene B1. A partir daí foram escolhidos somente fêmeas e machos homozigotos que não possuem a mutação. Os filhotes desse casal, conforme o padrão, eram 50% obesos (com mutação no gene da leptina) e 50% eram magros (heterozigotos para a mutação no receptor B1 de cininas).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após três semanas do transplante de tecido adiposo observou-se a redução de peso e a restauração da fertilidade dos camundongos ob/ob, evidenciado pelo seu interesse junto às fêmeas e pela geração de uma prole, demonstrando que a técnica é eficaz.

Através da genotipagem do gene OB foi possível identificar anteriormente ao processo de retrocruzamento os camundongos homozigotos para a mutação no gene da leptina, e a genotipagem do gene B1 identificou-se diferentes padrões genéticos quanto a mutações no receptor de cininas, permitindo que somente os animais idôneos fossem designados ao processo.

Levando em consideração que os esquemas de retrocruzamento tradicionais não contam com o transplante de tecido adiposo como facilitador do processo, ao atentar para a necessidade de cirurgia, pode-se assentar a ideia de que os modelos tradicionais seriam mais fáceis de serem realizados, além de mais baratos. Entretanto, os modelos tradicionais exigem mais genotipagens para o gene da leptina quando as mutações não levam ao fenótipo visível, logo, o gasto com inúmeros reagentes que técnica exige compensa o aumento de gastos e o trabalho requerido. Neste mesmo aspecto, deve-se ressaltar que a probabilidade de animais férteis disponíveis para montar a maternidade no modelo estudado

chega a 100% graças ao transplante de tecido adiposo, que possibilita que camundongos com mutação no gene da leptina, restaurem a fertilidade e possam procriar. Por fim, o modelo proposto não necessita de genotipagem para o gene da leptina para repor as matrizes da maternidade de produção, enquanto nos modelos tradicionais esta genotipagem se faz necessária. Logo, foi evidenciado que o método proposto é de fato mais eficaz.

4. CONCLUSÕES

Conclui-se o modelo experimental proposto realmente é mais eficiente, tendo em vista que além de poupar o tempo dos pesquisadores e diminuir custos financeiros da instituição de ensino onde será realizado, permite que o pesquisador conte com um padrão genético de diferentes animais experimentais, o que aumentará a acurácia de futuros estudos, pois a ausência de variáveis genéticas inter-animais permite somente a influência das variáveis ambientais ou experimentais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- COUTINHO, W., DUALIB, P. Etiologia da obesidade. **Revista abeso**, v.7, n.30, p. 1-14, 2007.
- 2- SPEAKMAN, HAMBLY C., MITCHELL S., KRÓL E. The contribution of animal models to the study of obesity. **Laboratory animals**. v.42, n.4, p.413-432, 2008.
- 3- PERRY, W. L., COPELAND, N. G. e JENKINS, N. A. The molecular basis for dominant yellow agouti coat color mutations. **Bioessays**, v.16, n.10, p.705-7, 1994.
- 4- CHARLTON, H. M. Mouse mutants as models in endocrine research. **Experimental Physiology**, v.69, n.4, p.655-76, 1984.
- 5- PESQUERO, J. B., ARAUJO, R. C., HEPPENSTALL, P. A., STUCKY, C. L., SILVA, J. A., JR., WALTHER, T., OLIVEIRA, S. M., PESQUERO, J. L., PAIVA, A. C., CALIXTO, J. B., LEWIN, G. R. e BADER, M. Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. **Proceedings National Academy of Sciences of the United States of America**, v.97, n.14, p.8140-5, 2000.
- 6- MORI, M.A., ARAUJO R.C., REIS, R.C., SGAI, D.G., FONSECA, R.G., BARROS, C.C., MERINO, V.F., PASSADORE, M., BARBOSA, A.M., FERREIRA, B., CARAYON, P., CASTRO, C. H.M., SHIMUTA, S.I., LUZ, J., BASCANDS, J., 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. **Diabetes**, v.56, n.6, p.1491-1500, 2008.
- 7- BAILEY D.W. How pure are inbred strains of mice? **Immunology Today**, v.3, n.8, p.201-214, 1982.
- 8- ELLETT, J.D., EVANS, Z.P., ZHANG, G., CHAVIN, K.D., SPYROPOULOS, D.D. A Rapid PCR-based Method for the Identification of ob Mutant Mice. **Obesity**, v.17, n.2, p.402-404, 2009.