

## GENOTIPAGEM DE CAMUNDONGOS C57BL/6 COM MUTAÇÃO NO GENE DA LEPTINA (*ob*)

DOUGLAS MESQUITA FIGUEIREDO<sup>1</sup>; BIANCA DE OLIVEIRA SCHUMACHER<sup>2</sup>;  
IRAÊ DE LIMA MOREIRA<sup>2</sup>; MARIANE DA SILVA DIAS<sup>2</sup>; AUGUSTO  
SCHNEIDER<sup>3</sup>; CARLOS CASTILHO BARROS<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico do Curso de Nutrição UFPel – [fdmesquita2008@hotmail.com](mailto:fdmesquita2008@hotmail.com);

<sup>2</sup>Acadêmicos do Curso de Nutrição UFPel – [bianca.ocs@hotmail.com](mailto:bianca.ocs@hotmail.com); [irae\\_moreira@hotmail.com](mailto:irae_moreira@hotmail.com);  
[mariianedias@hotmail.com](mailto:mariianedias@hotmail.com);

<sup>3</sup>Docente da Faculdade de Nutrição UFPel – [augustoschneider@gmail.com](mailto:augustoschneider@gmail.com);  
[barros\\_cc@yahoo.com.br](mailto:barros_cc@yahoo.com.br)

### 1. INTRODUÇÃO

O constante aumento das doenças crônicas não transmissíveis, como a obesidade, tem impacto significativo sobre o quadro mundial de morbimortalidade (WHO, 2005). Devido à magnitude e à rápida evolução em diversos países, como o Brasil, a obesidade tem sido definida como uma pandemia (BRASIL, 2006; MARQUES-LOPES et al, 2004). Conseqüentemente ocorre o aumento da incidência e da prevalência de doenças correlatas como a diabetes, dislipidemia e síndrome metabólica.

Diversos modelos experimentais foram desenvolvidos para compreender a fisiopatologia da obesidade e elaborar estratégias terapêuticas contra essa patologia (CESARETTI & KOHLMANN, 2006; KANASAKI & KOYA, 2011). Dentre os modelos experimentais utilizados atualmente, destaca-se o uso dos animais geneticamente obesos. Esses modelos podem ser obtidos através de mutações monogênicas, como ocorre em animais com mutação no gene da leptina (*ob*), ou mutações poligênicas (HILZENDEGER, 2009).

ZHANG et al (1994) caracterizaram a mutação do gene *ob* como uma alteração de um único par de bases na região codificadora do hormônio leptina, que resulta num códon de finalização, produzindo assim uma proteína incompleta e sem atividade fisiológica. A leptina atua regulando o armazenamento e a utilização de energia do organismo por sinalizar ao sistema nervoso central o estado nutricional (FRIEDMAN & HALAAS, 1998; NEGRÃO E LICINIO, 2000; HILZENDEGER, 2009).

A mutação do gene *ob* possui caráter autossômico recessivo. Devido à ausência de leptina em seus organismos, os homocigotos *ob/ob* são hiperfágicos, letárgicos, inférteis, resistentes a insulina e obesos mórbidos (QIU et al, 2001; KLEBANOV et al, 2005; ELIAS & PUROHIT, 2012). Logo, esses animais são excelentes modelos de obesidade e diabetes (QIU et al, 2001; KANASAKI & KOYA, 2011). Os homocigotos *ob/ob* são facilmente diferenciados dos heterocigotos, *ob/+*, e dos controles (WT), *+/+*, pelas suas características fenotípicas. Porém os animais *ob/+*, essenciais para a manutenção da colônia por serem portadores férteis da mutação do gene *ob*, são fenotipicamente idênticos aos WT (ELLET et al, 2009). Sendo assim, faz-se o uso da genotipagem para diferenciar esses animais.

O objetivo do presente trabalho é genotipar os camundongos segundo a mutação do gene *ob*.

## 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.

Para genotipagem dos animais utilizou-se o protocolo adaptado de ELLET et al (2009). Trata-se de um método de genotipagem que utiliza a Técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) a partir de DNA extraído de biópsia da cauda de camundongos.

### 2.2. Reagentes

Para compor as soluções a Proteinase K foi obtida de Ambion (Van Allen Way Carlsbad, CA), Taq DNA polimerase recombinante, MgCl<sub>2</sub> e tampão de reação de Invitrogen (São Paulo, SP), dNTPs da Affymetrix (Ohio, USA) e primers da Exxtend (São Paulo, SP).

### 2.3. Processo de extração de DNA genômico (gDNA)

As amostras foram obtidas através de biópsia da cauda de filhotes com 30 dias de vida. Utilizou-se 2 mm de cauda digerido com 5 µL de proteinase K (Ambion) em 100 µL de EAR buffer, por 2 horas a 55 °C. As amostras em solução foram incubadas a 95 °C, por 10 minutos, para inativação da proteinase. Após foram adicionados 750 µL de TE buffer para cada amostra.

### 2.4. PCR:

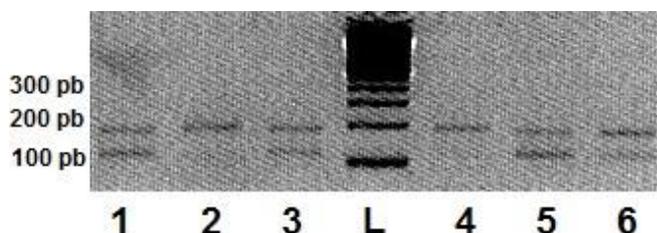
Um µL de cada amostra de gDNA foi utilizado na realização da PCR. Para compor as soluções, também fez-se o uso de 2,5 µL de tampão de reação, 1,25 µL de MgCl<sub>2</sub>, 1 µL de dNTPs, 1 µL do mix de primers, 0,1 µL de Taq DNA polimerase recombinante e 18,5 µL de água milli-Q. Os primers utilizados para realizar o mix estão de acordo àqueles desenvolvidos por ELLET et al (2009). As soluções foram colocadas no termociclador (MyGene Series Peltier Thermal Cycler, model MG96G) seguindo as condições de tempo e temperatura estipuladas por ELLET et al (2009).

Posteriormente, os produtos obtidos do PCR foram diferenciados por eletroforese, 135 V, 30 min, em gel 2% de UltraPure Agarose (Invitrogen, Carlsbad, CA) e analisadas em um sistema de fotodocumentação (GDS- 8000 System, UVP Biolmaging Systems).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

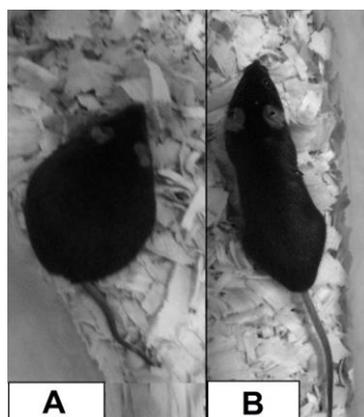
Ao início de nossos procedimentos encontramos algumas dificuldades com contaminação de material e padronização da técnica, que determinaram falhas nos resultados iniciais. Porém, a Figura 1 mostra o resultado dos produtos do PCR analisados em eletroforese. Observamos a expressão de bandas em diferentes alturas no gel de agarose, o que ressalta diferença em seu tamanho. As bandas acordam com as encontradas por Ellet et al (2009), confirmando o sucesso do método.

Foram genotipados 141 animais, sendo 8 matriz *ob/+*, e o restante oriundos de seus cruzamentos. Os animais *ob/ob* e *ob/+* expressam as duas bandas, controle e mutação, enquanto os animais WT somente a banda controle.



**Figura 1.** Resultado dos produtos da PCR analisados por eletroforese em gel de agarose 2%. O marcador (L) indica o tamanho das bandas. Amostras 2 e 4 apresentaram somente banda controle enquanto demais apresentaram, também, banda mutação.

Para os animais *ob/ob* houve a confirmação pelo fenótipo, conforme mostra a Figura 2. Os animais *ob/+* e WT foram confirmados através de sua prole, seguindo os preceitos da Lei de Mendel. Animais *ob/+* produzem 25% de animais *ob/ob*, 25% WT e 50% *ob/+*.



**Figura 2.** Diferenciação fenotípica dos animais, ambos com 14 semanas. O animal A possui fenótipo compatível com *ob/ob* e animal B compatibilidade com *ob/+*.

#### 4. CONCLUSÕES

A técnica de genotipagem para mutação do gene *ob*, finalmente, está estabelecida no Laboratório de Nutrição Experimental da Faculdade de Nutrição, da Universidade Federal de Pelotas. Métodos similares podem ser empregados na análise de diversos genes, inclusive de humanos.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

HILZENDEGER, AM. **Obesidade, Leptina e Sistema Renina-Angiotensina: Importância no controle da Pressão Arterial e Regulação Autonômica em camundongos ob/ob e db/db**. 2009. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, Universidade Federal de São Paulo

ZHANG, Y; PROENÇA, R; MAFFEI, M; BARONE, M; LEOPOLD, L; friedman, JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, 372, p.425-32, 1994.

FRIEDMAN, JM; HALAAS, JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. **Nature**, 395, p.763-770, 1998.

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.

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.

KLEBANOV, S; ASTLE, CM; DESIMONE, O; ABLAMUNITZ, V; HARRISON, D. Adipose tissue transplantation protects *ob/ob* mice from obesity, normalizes insulin sensitivity and restores fertility. **Journal of Endocrinology**, v.186, p. 203–211, 2005.

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

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