Controle genético e genotipagem de ratos Zucker (fa/+) para a manutenção da linhagem de modelos animais para o estudo do Diabetes humano.

Amanda B. Pustiglione[1], Clélia R. A. Bertoncini[2], Daniel S. Vilas Boas[1]

[1]Universidade Santa Cecília (UNISANTA), Santos-SP, Brasil
[2]Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) – Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais (CEDEME), São Paulo-SP, Brasil

Email: amanda.pustiglione@gmail.com

Resumo: O diabetes *mellitus* é uma doença crônica, em que grande parte de suas complicações torna o indivíduo incapaz de realizar suas atividades cotidianas. É classificada em geral em 2 tipos: Tipo 1 que é caracterizado por deficiência absoluta de insulina devido a destruição das células β pancreáticas e 2 que é causado por uma combinação de resistência periférica a insulina e uma resposta secretora inadequada das células β. Sabe-se que nenhum modelo animal de diabetes apresenta 100% de identidade à síndrome humana, porém ratos Zucker tem apresentado resultados satisfatórios. O presente estudo teve como objetivo criar e manter uma linhagem de modelos animais para estudo do diabetes humano através de técnicas moleculares de controle genético e genotipagem de ratos Zucker (fa/+).O protocolo de genotipagem foi adaptado a partir de metodologias previamente estabelecidas e realizadas em termociclador de PCR. Após as reações, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose em tampão TBE contendo brometo de etídeo, utilizando padrão de DNA com 100pb.Para a confirmação da identidade, os produtos amplificados por PCR foram submetidos à digestão pela enzima de restrição *Msp* I. Através deste estudo concluímos que dos 70 neonatos genotipados, 20% nasceram normais, e 77,1% heterozigotos (possuem a mutação). E que esses 77,1% é que devem ser usados para a manutenção da linhagem, separando por sexo, para acasalar.

Palavras-chave: Diabetes *mellitus*, genotipagem, ratos Zucker.

Genetic control and genotyping of Zucker rats (fa / +) for the maintenance of lineage of animal models for the study of human Diabetes.

Abstract: Diabetes *mellitus* is a chronic disease, in which much of its complications makes the individual unable to perform their daily activities. It is generally classified into 2 types: Type 1 which is characterized by absolute insulin deficiency due to destruction of pancreatic β cells and 2 which is caused by a combination of peripheral insulin resistance and an inadequate secretory response of β cells. It is known that no animal model of diabetes presents 100% identity to the human syndrome, but Zucker rats have presented satisfactory results. The present study aimed to create and maintain a lineage of animal models for the study of human diabetes through genetic techniques of genetic control and genotyping of Zucker (fa/+) rats. The genotyping protocol was adapted from previously established methodologies and performed in a PCR thermocycler. After the reactions, the PCR products were submitted to agarose gel electrophoresis in TBE buffer containing ethidium bromide, using DNA standard with 100pb. For the confirmation of the identity, the products amplified by PCR were submitted to digestion by the restriction enzyme *Msp* I. Through this study we conclude that of the 70 genotyped neonates, 20% were born normal, and 77.1% were

heterozygous (mutated). And that these 77.1% is that they should be used for the maintenance of the lineage, separating by sex, to mate.

Keywords: Diabetes *mellitus*, genotyping, Zucker rats

Introdução

A Diabetes *Mellitus* (DM) é uma doença crônica que é caracterizada pelo aumento nos níveis da glicose no sangue, podendo ser por falta de produção e/ou incapacidade da insulina exercer sua função, trazendo assim muitas complicações [1].

A Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) 2016 [2] diz que estima-se que a população mundial portadora de diabetes atualmente seja de 387 milhões e que até 2035 pode chegar a 471 milhões. O número de diabéticos tem aumentado devido ao crescimento e envelhecimento da população, onde a maioria dos portadores tem como prevalência a obesidade e o sedentarismo.

A Diabetes Mellitus do tipo 1 (DM1), é considerada autoimune e é encontrada em 5 a 10% nos casos de DM. Ocorre quando há a destruição das células beta, diminuindo a produção de insulina, podendo ser um fator genético e ambiental. A Diabetes Mellitus 2 (DM2) é encontrada em 90 a 95% dos casos e ocorre pela má ação e secreção de insulina [2].

O uso de animais em pesquisa é visto na historia da ciência e da humanidade e é motivo de debate nos dias atuais. Os modelos animais garantiram grandes descobertas biomédicas e acompanharam o desenvolvimento tecnológico. Sabe-se que nenhum modelo animal de diabetes apresenta 100% de identidade à síndrome humana, entretanto, os modelos animais de DM2 induzido por mutação (modelos genéticos) têm sido amplamente utilizados em pesquisas com resultados satisfatórios. Dentre esses, destaca-se o rato Zucker (*Zucker diabetic fatty* - ZDF), um modelo animal do DM2 adipogênico humano.

Esses ratos apresentam uma mutação denominada *fatty* que os impedem de sintetizar adequadamente os receptores de leptina. Tornam-se obesos com cerca de 3 a 5 semanas de vida e com 14 semanas apresentam mais de 40% de seu corpo constituído por lipídeos [3].

Os animais homozigotos para a mutação (fa/fa) não conseguem copular e por isso, não geram descendentes. Os animais férteis homozigotos (+/+) e os heterozigotos (fa/+) não apresentam obesidade e por esse motivo não podem ser diferenciados fenotipicamente. A manutenção das linhagens de modelos, portanto, depende do acasalamento dos indivíduos heterozigotos, que são identificados pelas técnicas moleculares de controle genético e genotipagem.

O desenvolvimento e manutenção da linhagem de modelo animal para o DM vêm contribuir sobremaneira com os estudos dessa doença, pois possibilitará o atendimento crescente à demanda por esta linhagem, por parte dos pesquisadores.

Objetivo

O presente estudo teve como objetivo criar e manter uma linhagem de modelos animais para estudo do diabetes humano através de técnicas moleculares de controle genético e genotipagem de ratos Zucker (fa/+).

Materiais e Métodos

O presente estudo foi aprovado em 21 de Maio de 2009 pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Santa Cecília sob número do protocolo 78/09.

O DNA total das amostras foi extraído utilizando-se o método do Fenol-Clorofórmio conforme instruções do fabricante. A amostra foi centrifugada (1500 rpm x 10 minutos) e lavada 2x em PBS gelado pH 7,2. O tecido foi homogenizado com auxílio de um pistilo em tubo eppendorf. Logo após, suspendeu-se o pellet em tampão de extração. Foi também utilizada uma concentração de 50µg de Proteinase K/mL de tampão de lise, foi incubada à 42ºC por pelo menos 1h. E a Proteinase K foi adicionada somente na hora do uso.

Foi adicionado um volume igual de Fenol equilibrado e misturado com cuidado por 10 minutos e centrifugada por mais 10 minutos. Quando a fase aquosa aparecesse “nebulosa”, foi adicionado um volume igual de clorofórmio e centrifugado por 10 minutos, quando a fase aquosa aparecesse clara, transferiu-se a mesma para um novo tubo. Depois, foi adicionado o mesmo volume de uma mistura Fenol-Clorofórmio (1:1) e misturada por inversão do tubo com cuidado por 10 minutos. Foi centrifugada por 10 minutos a 4ºC.

Transferiu-se a fase líquida para um tubo limpo e adicionado um volume igual de clorofórmio e misturado por 10 minutos, centrifugado por 10 minutos a 4ºC.

A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e adicionou-se o volume de 1/10, de uma solução 3M de acetato de sódio pH 5,2 e 2,5x o volume total de etanol 100% gelado e foi incubado em geladeira 4ºC por 15 minutos.

Centrifugou-se por 30 minutos. Após, o sobrenadante foi descartado e o pellet lavado duas vezes com 500µL de etanol 70% gelado, centrifugando por mais 10 minutos. Secou-se, invertendo o tubo em TA por 10 minutos. Suspendeu-se o pellet em 50µL de TBE (incubando

o pellet por alguns minutos a 60ºC para auxiliar na solubilização) e foi tratado com 1µL de RNAse por 1 hora a 37ºC.

O conteúdo de DNA total foi quantificado por absorbância em espectrofotômetro. Considerando uma unidade de absorbância a 260nm corresponde a 40µg/mL de DNA.

Para a reação de PCR foi utilizado: 2µl DNA resultante a extração, 1 µl de primer (concentração de 50ng/µl) de forward (5´- GTT TGC GTA TGG AAG TCA CAG - 3´), 1 µl de primer (concentração de 50ng/µl) de reverse (5´ - ACC AGC AGA GAT GTA TCC GAG – 3´), 10 µl de reagentes contidos no kit master mix e 11 µl de água (do kit master mix), resultando em um volume final de 25µl.

O protocolo de genotipagem foi adaptado a partir de metodologias previamente estabelecidas [4-5] e realizada em termociclador de PCR utilizando o seguinte programa: 1) 94ºC por 5 minutos; 2) 32 ciclos de: a) desnaturação a 92ºC por 45 segundos; b) anelamento dos primers a 54ºC por 1 minuto; c) extensão a 68ºC por 5 minutos; 3) extensão final e estabilização do produto a 72ºC por 10 minutos.

Após as reações, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE contendo brometo de etídeo (10µg/mL), utilizando padrão de DNA com 100pb. Para a confirmação da identidade, os produtos amplificados por PCR foram submetidos à digestão pela enzima de restrição *Msp* I que tem como sítio de restrição: **5'...C↓CGG...3'**.

Resultados

Dos cruzamentos selecionados, 70 filhotes foram escolhidos para genotipagem. Nas quais: 14 indivíduos considerados normais (20%) e 54 heterozigotos (77,1%).

Indivíduos normais: 16, 20, 23, 27, 32, 44, 47, 49, 51, 53, 54, 61, 62 e 66.

Indivíduos heterozigotos: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 21, 22, 24, 25, 26, 28, 29, 30, 31, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 46, 48, 50, 52, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 63, 64, 65, 67, 69 e 70.

Foi feita uma duplicata nos indivíduos 5, 13, 17, 2, 33, 34, 63, 67 e 68 para uma confirmação da mutação.

Foi observado que nos indivíduos de número 34 e 68 houve degradação do DNA, por isso, não foi possível identificá-los.

Discussão

O uso de modelos animais tem ajudado cada vez mais em grandes descobertas para análises e tratamentos, mas para isso é preciso estar por dentro dos métodos e meios de uso dos animais em experimentação. Segundo Seelig 2007 [6], a maioria dos animais de laboratórios utilizados para experimentações são modificados geneticamente.

Sabe-se que nenhum modelo animal possui 100% de igualdade das síndromes humanas por diversos motivos, como alimentação, habitação, entre outros, porém os ratos Zucker, tem obtido resultados satisfatórios. Sabe-se que os modelos animais, possuem certas restrições, mas com estes é possível chegar a muitas soluções clínicas.

Os modelos animais, são fundamentais nas pesquisas pré-clínicas de desenvolvimento de novos fármacos. Através destes, são feitos estudos de toxicidade, carcinogenicidade e teratogenicidade, para verificar se a prole não foi afetada. Essa é uma área de grande importância no âmbito farmacêutico, pois é através das genotipagens para manutenção de linhagens que obtemos os modelos experimentais para as fases de pesquisa clínica (fase pré-clínica).

Conclusões

Podemos concluir que dos 70 neonatos, 20% nasceram normais, e 77,1% heterozigotos (possuem a mutação). E que esses 77,1% é que devem ser usados para a manutenção da linhagem, separando por sexo, para o acasalamento.

Agradecimentos: Agradeço ao professor Daniel e a professora Clélia por me permitir a fazer esse estudo e ao grande apoio dado, a Capes por me dar a oportunidade de continuar a realizar outras pesquisas de tanta importância.

Referências

1. Patricio, R, Cabral, S, Pinto IC, Pereira, OR (2015) Diabetes *mellitus* na comunidade do Instituto Politécnico de Bragança: caracterização e conhecimentos. II Congresso Internacional da Saúde Gaia Porto: Livro de Atas, Porto: Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Instituto Politécnico do Porto (ESTSP-IPP), p 56-60.
2. SBD, Sociedade Brasileira de Diabetes. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2015-2016). Oliveira, JEP, Vencia, S (org.) (2016) São Paulo: A.C. Farmacêutica.
3. Zucker, LM, Zucker, TF (1961). Fatty, a new mutation in the rat. J. Hered. 52:275-278.
4. Phillips TR, Maluendes S, Green S (1996) Collisional excitation of H_2O by H_2 molecules. *Astrophys. J. Supp. Series*, 107, 467-474, doi: 10.1086/192372.
5. Takaya T, Kato H, Takiguchi M (1996). Optimum priming dose of vecuronium for tracheal intubation. J. Anesth, 10(4): 244-247.
6. Seelig, VC (2007) Questões atuais ao uso de modelos animais em pesquisa científica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.