

## Zebrafish é aposta na investigação das doenças raras

Os erros inatos do metabolismo (EIM) formam um grupo de doenças genéticas relacionadas a alterações em processos bioquímicos do organismo. A maioria dos EIM se manifesta na faixa etária pediátrica, mas pode ocorrer em qualquer idade. Até o momento, mais 550 doenças metabólicas são conhecidas. Se consideradas de maneira isolada, a incidência de cada uma delas é rara.

A bióloga Marcella Bergamini de Baptista propôs em sua tese de doutorado a utilização do *Dario rerio* ou *zebrafish*, mais conhecido como peixe Paulistinha, como modelo animal para o estudo da gangliosidose GM1, um distúrbio enzimático raro causado pela diminuição da enzima beta-galactosidase que leva ao acúmulo de gangliosídeos dentro dos lipossomos. A pesquisa ficou em primeiro lugar durante a X Semana de Pesquisa da FCM, que reuniu mais de 140 trabalhos desenvolvidos por grupos de pesquisa da FCM e da Unicamp.

O gangliosídeo GM1 está presente na membrana celular de todos os tecidos dos vertebrados. O crescimento e maturação do sistema nervoso central são influenciados pelos gangliosídeos. O cérebro contém a maior quantidade de gangliosídeos: de um a dois gramas por quilo é composto por GM1.

“A principal característica da gangliosidose é o acúmulo progressivo de macromoléculas. Quase dois terços dos pacientes apresentam neurodegeneração em uma região específica do cérebro, antes de afetar todo o sistema nervoso central”, explica Marcella.

A gangliosidose GM1 é classificada em três formas clínicas de acordo com a idade, atividade enzimática e gravidade. A do tipo I ou forma infantil tem início até o sexto mês de vida e evolui de forma rápida. Os pacientes podem apresentar falta de apetite e dificuldade de sucção, disartria,

disfagia, tremores nas mãos, rigidez nos braços, pernas e dificuldade para andar.

As características principais do tipo II ou juvenil são o atraso no desenvolvimento do sistema motor e cognitivo, lipidose neuronal e distormorfismos esqueléticos. Já a do tipo III ou adulta a distonia – movimento involuntário que pode ocorrer em qualquer região do corpo – é a principal manifestação neurológica, além de deformidades esqueléticas e dificuldades para falar e andar.

“Atualmente não existem tratamentos efetivos para a gangliosidose GM, apenas terapias de apoio. Modelos animais são estudados para entender as bases molecular e celular da doença, além de testes para novos tratamentos e medicamentos antes do uso em humanos”, revela Marcella.



Foto: Rafael Marques

### Um peixe parecido com você

Ratos e camundongos são tradicionalmente utilizados em pesquisa sobre gangliosidose GM1. Entretanto, esses modelos animais não permitem a observação de todos os aspectos clínicos da doença. Nesse sentido, o *zebrafish* possui vantagens para a manipulação genética para o estudo de doenças de depósito lipossômicas (DDL).

Uma das vantagens do *zebrafish* é possuir uma grande parte dos órgãos e sistemas similares ao dos humanos – 70% dos genes são semelhantes ao genoma humano e o genoma completo do *zebrafish* está disponível em bancos de dados. Um casal de peixes pode ter até 200 embriões por semana. Isso permite gerar uma mostra estatisticamente relevante por um baixo custo.

“Os peixes são transparentes durante as fases iniciais. Quando há manipulação genética no embrião, os fenótipos tendem a se manifestar durante o estágio larval, o que torna possível uma avaliação *in vivo* não invasiva. Até o momento, menos de seis DDL foram reproduzidas em *zebrafish*. O objetivo da pesquisa foi caracterizar o *zebrafish* para estudos funcionais do gene *glb1*”, revela.


A obtenção de embriões foi por meio de acasalamento natural. A bióloga usou a técnica de morfolino (MO) que consiste na microinjeção de oligonucleotídeos antisense nos peixes ainda na fase de embrião para silenciar temporariamente a expressão da enzima beta-galactosidase do gene *glb1* nas larvas.

Os animais foram observados diariamente, desde a fertilização até o quinto dia, quando o MO começa a perder sua função de inibição. Após 96 horas do período de fertilização, as alterações esqueléticas cartilaginosas ficaram evidentes. Com 120 horas, em cinco animais foi observada a progressão das malformações.

“Dois dias pós-fertilização, a alteração de face nos embriões de *zebrafish* era sutil, porém com sugestiva correspondência ao engrossamento facial observado nos pacientes com gangliosidose GM1. Os animais também apresentaram funções neurológicas alteradas”, disse Marcella.

De acordo com a pesquisadora da Unicamp, para essa doença, manipulável em laboratório, nenhum outro modelo animal apresentou alterações no desenvolvimento ósseo ao ter o gene *glb1* silenciado como o *zebrafish*.

“Até o momento, o *zebrafish* tem se apresentado como um futuro modelo animal válido para o estudo da beta-galactosidase”, explica Cláudia Vianna Maurer Morelli, uma das orientadoras da pesquisa.

“Um único animal não consegue contemplar todos os sinais e sintomas de uma mesma doença. Por isso, os resultados de *zebrafish* complementam a pesquisa da gangliosidose GM1, juntamente com os outros modelos animais estudados até o momento. Apesar dos bons resultados, mais pesquisas são necessárias para um conhecimento mais completo com relação à doença nesse animal”, diz Marcella. 

## Você sabia?

A gangliosidose é uma doença neurodegenerativa causada pela deficiência da enzima beta-galactosidase. Essa enzima é responsável por ajudar lisossomos das células a digerirem substâncias orgânicas. A incidência da gangliosidose no Brasil é de um para cada 17 mil nascimentos.

**Tese:** Gangliosidose GM1: proposta de estudo em modelo animal utilizando o Danio Rerio

**Autora:** Marcella Bergamini de Baptista

**Orientadores:** Carlos Eduardo Steiner e Cláudia Vianna Maurer Morelli

**Área:** Pós-graduação em Ciências Médicas

**Texto:** Edimilson Montalti

Assessoria de Relações Públicas e Imprensa da FCM, Unicamp