NICÁSSIA DE SOUSA OLIVEIRA

**Caracterização fenotípica do camundongo mutante *bate palmas*
induzido pelo agente mutagênico químico ENU (N- Ethyl- N-
Nitrosourea) como potencial modelo para a síndrome de Kabuki**

São Paulo

2017

NICÁSSIA DE SOUSA OLIVEIRA

Caracterização fenotípica do camundongo mutante *bate palmas* induzido pelo agente mutagênico químico ENU (N- Ethyl- N- Nitrosourea) como potencial modelo para a síndrome de Kabuki

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento

Patologia

Área de concentração

Patologia Experimental e Comparada

Orientador

Profa. Dra. Claudia Madalena Cabrera Mori

São Paulo

2017

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3514
FMVZ

Oliveira, Nicássia de Sousa

Caracterização fenotípica do camundongo mutante *bate palmas* induzido pelo agente mutagênico químico ENU (N-Ethyl-N-Nitrosourea) como potencial modelo para a síndrome de Kabuki. / Nicássia de Sousa Oliveira. -- 2017.
82 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profa. Dra. Claudia Madalena Cabrera Mori.

1. Gene *kmt2d*. 2. Mutação. 3. Comportamento. 4. Deficiência motora. 5. Doença genética. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Caracterização do camundongo mutante recessivo "bate palmas", induzido pelo agente mutagênico químico ENU, como potencial modelo para estudo da síndrome de Kabuki", protocolado sob o CEUA nº 1004070715, sob a responsabilidade de **Claudia Madalena Cabrera Mori e equipe; Nicássia de Sousa Oliveira; Maria Martha Bernardi; Sílvia Maria Gomes Massironi** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMZV) em reunião de 28/10/2015.

We certify that the proposal "Characterization of the recessive mutation "bate palmas" in mouse induced by the chemical mutagenic agent ENU as a potential model for study the Kabuki syndrome", utilizing 60 Isogenics mice (60 males), protocol number CEUA 1004070715, under the responsibility of **Claudia Madalena Cabrera Mori and team; Nicássia de Sousa Oliveira; Maria Martha Bernardi; Sílvia Maria Gomes Massironi** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of São Paulo University (CEUA/FMZV) in the meeting of 10/28/2015.

Vigência da Proposta: de 08/2015 a 08/2017

Área: Departamento De Patologia

Procedência: Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ-USP

Espécie: Camundongo Isogênico

Gênero: Machos

idade: 8 semanas

N: 30

Linhagem: BALB/c

Peso: 25g

Procedência: Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Imunologia do ICB/USP

Espécie: Camundongo Isogênico

Gênero: Machos

idade: 8 semanas

N: 30

Linhagem: bate palmas

Peso: 25g

São Paulo, 28 de outubro de 2015

Prof. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

São Paulo, 01 de junho de 2017
CEUA N 1004070715

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Cláudia Madalena Cabrera Mori
Área: Patologia
Claudia Madalena Cabrera Mori (orientador)

Título da proposta: "Caracterização do camundongo mutante recessivo "bate palmas", induzido pelo agente mutagênico químico ENU, como potencial modelo para estudo da síndrome de Kabuki".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ/USP

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 01/junho/2017) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "No projeto original foi aprovado o uso de 60 camundongos machos; no entanto, devido à dificuldade de reprodução dos camundongos mutantes, foram utilizados tanto os machos quanto as fêmeas para realização dos experimentos. Desta forma, solicito alteração do formulário para 30 machos e 30 fêmeas.".

Comentário da CEUA: "Emenda aprovada.".

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: OLIVEIRA, Nicássia de Sousa

Título: **Caracterização fenotípica do camundongo mutante *bate palmas* induzido pelo agente mutagênico químico ENU (N- Ethyl- N- Nitrosourea) como potencial modelo para a síndrome de Kabuki**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico esta dissertação primeiramente a Deus, por ter me ajudado nesta caminhada, minha mãe Maria do Amparo, meu irmão Cássio, meu amor Jules Marcelo, familiares e aos meus amigos.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus e a Nossa Senhora Aparecida, por ter me dado à família que eu tenho, saúde e por ter colocado pessoas tão especiais a meu lado, sem as quais com certeza eu não teria dado conta!

Aos meus pais, Francisco e Maria do Amparo, em especial minha mãe, que mesmo sendo da roça e não tendo a mesma oportunidade no passado, sempre me incentivou estudar, sempre fazendo eu acreditar que tudo nessa vida é possível, sempre acreditando na minha capacidade, e o principal ser sempre honesta. Isso só me fortaleceu e me fez tentar e nunca desistir dos meus sonhos. Minha mãe é a melhor mãe que alguém possa querer!

Ao meu irmão, Cássio Sousa, pois a seu modo sempre se orgulhou de mim e confiou na minha capacidade. Agradeço a Deus pelo irmão que eu tenho!

Ao meu amor, Jules Marcelo, pela sua incansável boa vontade em querer me ajudar, por perder noites de sono e fins de semana ao meu lado. Devido ao seu companheirismo, amizade, compreensão, apoio, alegria e amor, este trabalho pôde ser concretizado. Obrigada por ter feito do meu sonho o seu também!

Aos meus tios, tias, primos e primas, especialmente tia Conceição, minha priminha Eduarda, que torceram por mim desde a aprovação na prova e sempre fizeram propaganda positiva a meu respeito. Obrigada pela força!

A minha orientadora mais que perfeita, Professora Doutora Claudia Madalena Cabrera Mori, por ter me aceitado, sem, ao menos, me conhecer, você abriu as portas, como uma mãe que abre os braços para

receber um filho. Nesse mundo, repleto de pessoas ruins, você me fez acreditar que os bons são a maioria. Professora, só tenho a agradecer aos seus ensinamentos (pessoais e acadêmicos), orientações, palavras de incentivo, puxões de orelha, paciência e dedicação. Você é uma pessoa maravilhosa, na qual sempre vou buscar inspirações para me tornar melhor em tudo que eu faço e irei fazer daqui para frente. Tenho muito orgulho em dizer que um dia fui sua orientada!

A minha co-orientadora, Professora Martha Bernadi, por me mostrar os encantos do comportamento animal e pelos ensinamentos, orientações e contribuições. Por me receber de braços abertos e sempre estar à disposição e me incentivando acreditar que tudo daria certo. Realmente, deu certo, e você é parte essencial desse trabalho!

A minha colaboradora mais que perfeita, Profa. Dra. Sílvia Massironi, por ter criado o projeto de mutagênese denominado “Indução de Novas Mutações”, na qual originou-se os meus bêbes bate palmas. Você esteve ao meu lado esses dois anos e não mediu esforços para me ajudar. Obrigada Silvia por ter confiado a mim este lindo projeto e por estar sempre disponível, e sem você este trabalho não teria sido realizado!!

Ao professor ,Jorge, por ter contribuído com a realização da estatística dos testes comportamentais, pela gentileza e pela solicitude que sempre teve comigo. Muito Obrigada!

Aos meus professores da Universidade Federal do Piauí, Gregório Viana, Amilton Raposo e Roseverter Moreno, que disponibilizaram as cartas de recomendações para que eu pudesse ingressar no mestrado. Professores obrigada por terem confiado eu levar o nome da nossa UFPI!

Aos meus professores queridos da Universidade Federal do Piauí, Assis Viana (in memorian) e Silvana Medeiros por serem o meu exemplo na área de patologia animal. Professores, o ensinamento de vocês foi a base para eu ser aprovada no mestrado. Muito Obrigada!

A Médica Veterinária da Universidade Federal do Piauí, Silvéria Lira, por não me deixar desistir quando tudo parecia difícil e por ser minha consultora na área de animais de laboratório na UFPI. Muito Obrigada!

Aos meus amigos da Universidade Federal do Piauí, especialmente a dona Fátima, que foi como uma mãe. Muito Obrigada dona Fátima que mesmo estando bem longe a senhora sempre acreditou em mim!

A minha colega de equipe do mestrado, Marianna Manes, pelos momentos divididos juntos, pelos ensinamentos dos testes comportamentais e pela paciência de sempre ensinar as coisas com carinho. Mari, todas às vezes que precisei você ajudou com os testes comportamentais, ajudou trocar as minhas gaiolas, além de auxiliar com os meus resultados dos testes comportamentais, algumas vezes deixou de fazer as suas obrigações para tentar me ajudar, serei eternamente grata, com certeza essa fase foi muito mais leve, pois você compartilhou a experiência de você comigo. Deus abençoe você!

A Mariana Aranha pela ajuda incondicional, pela gentileza e pela solicitude que sempre teve comigo. Muito Obrigada!

Ao Pedro, meu salvador das análises dos vídeos dos testes comportamentais, sempre disponível para ajudar. Pessoa exemplo de solidariedade, competência e comprometimento. Muito obrigada pela ajuda, serei eternamente grata!

Ao Dennis Zanatto, pelas horas de estudo e por dividir conhecimento em inglês, pelo auxílio no desenvolvimento do projeto, por sempre arrumar um jeitinho de ajudar, sempre arrumar os equipamentos dos testes comportamentais, pelos ensinamentos no laboratório. Dennis você é o salvador da pátria e foi meu braço direito durante a realização do meu mestrado!

Ao Leonardo Mesquita pela ajuda incondicional. Muito Obrigada Leonardo!

Ao Tiago Souza, por disponibilizar a parte da realização do sequenciamento dos bate palmas e pelas dicas e ensinamentos. Muito Obrigada!

Aos amigos de equipe, Sandra, Danilo, Jilma, Ana e Elane que contribuíram em grande parte da minha formação científica. Foi muito bom contar com você!

Aos meus amigos da pós-graduação, Thaisa Medeiros, Natalia, Paulinha, Everton e a Luana que auxiliaram na estatística dos testes comportamentais, como também na elaboração da dissertação, muito obrigada pela disponibilidade e comprometimento que tiveram comigo!

As amigas, Fabiane e Andressa, especialmente a Fabiane, que foi uma amiga muito especial que eu fiz durante o mestrado e por muitas vezes ajudaram na realização dos testes comportamentais. Meninas, obrigada pela disponibilidade, comprometimento, assim como as conversas que tiveram comigo!

Ao laboratório de Farmacologia, em especial ao Wagner e o Herculano, que com ensinamentos, orientações e amizade, me ajudaram ativo ou passivamente neste projeto. Vocês foram referências para mim!

As amigas, Andressa Areválo e Silvana, por terem dividido espaço de vocês comigo quando eu não tinha lugar para dormir em São Paulo. Andressa, obrigada pelos resumos e dicas na área da patologia para que eu pudesse ser aprovada na prova do mestrado, pelas conversas e por aguentar meu choro quando eu não passei na prova de proficiência em inglês. Silvana, obrigada por ser minha amiga, companheira em São Paulo e por ter sido a primeira pessoa incentivar eu conseguir esse título. Você deu a mão quando eu mais precisei. Serei eternamente grata meninas!

Aos técnicos do biotério da patologia, Luciana Bandini, Nelsinho e Mauro por estarem sempre disposto a me ajudar, principalmente a Luciana que por muitas vezes me ajudou no trato dos animais e também com dicas na área de biotério. Muito Obrigada!

A todos os funcionários desta instituição, especialmente a Milena e a Adriana, pela disponibilidade, simpatia e gentileza. Muito Obrigada pela ajuda!

Ao Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Imunologia, ICB/USP pela disponibilidade dos animais.

A CAPES pelo apoio financeiro.

Aos membros da banca de mestrado, Esther Camargo e Thiago Kirsten, que destinam parte de seu valioso tempo para avaliar o meu trabalho. Muito Obrigada!

Finalmente, gostaria de agradecer à Faculdade de Medicina Veterinária- USP que abriu as portas para que eu pudesse realizar esse sonho que era a minha dissertação de mestrado.

NINGUÉM VENCE SOZINHO. MUITO OBRIGADA A TODOS!

“Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá.”

Ayrton Senna

RESUMO

OLIVEIRA, N. S. Caracterização fenotípica do camundongo mutante *bate palmas* induzido pelo agente mutagênico químico ENU (N-Ethyl- N-Nitrosourea) como potencial modelo para a síndrome de Kabuki. [Phenotypic characterization of the mutant mouse *bate palmas* induced by the chemical mutagenic agent ENU (N-Ethyl- N-Nitrosourea)]. 2017. 82f. (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

O camundongo mutante denominado *bate palmas* (BALB/c^{bapa}) originou-se de mutagênese química induzida por N-ethyl-N-nitrosourea (ENU). Suas principais características fenotípicas são alterações posturais com movimentos anormais dos membros posteriores quando suspenso pela cauda, simulando o ato de “bater palmas”. A partir do padrão de herança a mutação foi identificada como autossômica recessiva. Os resultados do sequenciamento do exoma apontaram como forte candidato o gene lysine (K)-specific methyltransferase 2D (*kmt2d*, também conhecido como *mll2* ou *mll4*), localizado no cromossomo 15 do camundongo. Essa mutação foi confirmada através de sequenciamento do DNA pelo método de Sanger. A perda da função do gene KMT2D, localizado no cromossomo 12 em humanos, foi descrita como responsável pela síndrome de Kabuki, que é uma anomalia congênita rara, autossômica dominante, também conhecida como síndrome Niikawa-Koruki. O fenótipo clínico da doença é variável, mas algumas características mais comuns são face dismórfica, anormalidades esqueléticas, alterações dermatoglíficas, leve a moderado retardo mental e retardo do crescimento pós-natal. O presente estudo teve como objetivo caracterizar o fenótipo do camundongo mutante *bate palmas* a partir da análise de parâmetros comportamentais. Para tanto, foram utilizados 30 camundongos mutantes *bate palmas*- sendo 15 machos e 15 fêmeas- e seus respectivos controles BALB/c, com oito semanas de idade no início dos experimentos. Os testes comportamentais foram realizados em ordem crescente de estresse e ordenados na seguinte sequência 1) observação direta em campo aberto dos parâmetros da atividade geral, sensoriais, psicomotores e os ligados ao sistema nervoso central e autônomo; 2) ansiedade e memória no teste do labirinto em cruz elevada; 3) memória operacional no teste do labirinto em T; 4) coordenação motora no teste da trave elevada e 5) comportamento do tipo depressivo nos testes de suspensão pela cauda e natação forçada. Os dados obtidos no presente estudo demonstraram que o mutante *bate palmas* apresentou aumento na frequência de levantar em ambos os sexos, sugerindo comportamento estereotipado; no entanto, não houve alteração na atividade geral. Na avaliação do sistema sensorial houve redução no reflexo auricular e na resposta de aperto de cauda do mutante *bate palmas*. Em relação aos parâmetros psicomotores houve diminuição do reflexo de endireitamento e queda do trem posterior, sugerindo deficiência motora, como a hipotonia. Os resultados do teste de labirinto em cruz elevada identificaram menor nível de ansiedade nos mutantes em comparação aos controles. Ainda, as respostas

observadas no segundo dia do teste mostraram que não houve perda de memória dos *bate palmas*. Além disso, o teste do labirinto em T mostrou que não houve alteração na memória espacial dos camundongos mutantes em relação aos BALB/c. Já os resultados dos testes de suspensão pela cauda e de natação forçada foram semelhantes, indicando maior tempo de imobilidade dos mutantes em comparação aos BALB/c. Analisados em conjunto, os resultados desse estudo sugerem que o mutante *bate palmas* apresentou alterações nos parâmetros sensoriais e psicomotores e possível comportamento estereotipado, relacionadas à mutação do gene *kmt2d*.

Palavras-chave: Gene *kmt2d*. Mutação. Comportamento. Deficiência motora. Doença genética.

ABSTRACT

OLIVEIRA, N. S. Phenotypic characterization of the mutant mouse *bate palmas* induced by the chemical mutagenic agent ENU (N-Ethyl- N-Nitrosourea) as potential model for Kabuki syndrome. [Caracterização fenotípica do camundongo mutante *bate palmas* induzido pelo agente mutagênico químico ENU (N- Ethyl- N-Nitrosourea) como potencial modelo para a síndrome de Kabuki]. . 82f. (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

The mutant mouse denominated “bate palmas” (BALB/c^{bapa}) originated from chemical mutagenesis induced by N-ethyl-N-nitrosourea (ENU). Its main phenotypic characteristics are postural alterations with abnormal movements of the hind limbs when suspended by the tail, simulating the act of “clap hands”. The inheritance pattern of the mutation was identified as autosomal recessive. The potential candidate gene lysine (K) -specific methyltransferase 2D (kmt2d, also known as mll2 or mll4), located on chromosome 15 of the mouse, was identified by the exome sequencing. This mutation was confirmed by DNA sequencing by the Sanger method. The loss of function of KMT2D gene, located on chromosome 12 in humans, has been described as responsible for Kabuki syndrome, which is a rare congenital anomaly, autosomal dominant, also known as Niikawa-Koruki syndrome. The clinical phenotype of the disease is variable, but some common features are dysmorphic face, skeletal abnormalities, dermatoglyphic changes, mild to moderate mental retardation and postnatal growth retardation. The present study aimed to characterize the phenotype of the mutant mouse *bate palmas* from the analysis of behavioral parameters. Therefore, 30 mutant mice were used - 15 males and 15 females - and their respective BALB/c controls, at eight-wk-old at the beginning of the experiments. Behavioral tests were performed in increasing order of stress and ordered in the following sequence: 1) direct observation in the open field of the parameters linked to general activity, sensorial and psychomotor systems, and those connected to the central and autonomic nervous system; 2) anxiety and memory in the elevated plus maze test; 3) operating memory in the T-maze test; 4) motor coordination in the balance beam test, and 5) depressive-like behavior in the tail suspension and forced swimming tests. The data obtained in the present study demonstrated that the mutant *bate palmas* presented increase in the rearing frequency in both sexes, suggesting stereotyped behavior; however, there was no change in the general activity. The evaluation of the sensory system demonstrated reduction in the auricular reflex and the tail flick response of the mutant *bate palmas*. Regarding to the psychomotor parameters, there were observed impairments in the surface-righting reflex and hindquarter fall, suggesting motor deficiency, such as hypotonia. The results of the elevated plus maze test identified a lower level of anxiety in the mutants compared to controls. Still, the responses observed on the second day of the test showed that there was no loss of memory of the *bate palmas*. In addition, the T-maze test showed that there was no change in the spatial memory of the mutant mice in relation to BALB/c mice. Data of the tail suspension and forced

swimming tests were similar, indicating a longer immobilization time of the mutants compared to BALB/c mice. Taken together, the results of this study suggest that the mutant *bate palmas* showed impairments of the sensorial and psychomotor parameters, and possibly stereotyped behavior related to the mutation of the *kmt2d* gene.

Keywords: *kmt2d* gene. Mutation. Behavior. Motor deficit. Genetic disease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1–	Sequência dos testes comportamentais utilizados para a fenotipagem dos camundongos mutantes bate palmas	36
Figura 2 –	Ilustração da arena do campo aberto (visto de cima) com sua respectiva dimensão .	38
Figura 3 –	Ilustração do labirinto em cruz elevado subdividido em área central, braços abertos, braços fechados com suas respectivas dimensões.....	43
Figura 4 –	Ilustração do Labirinto em T (visto de cima) subdividido em braço A, B e C com sua respectiva dimensão.	44
Figura 5 –	Ilustração da trave elevada (visto de lado) com a lâmpada no início utilizada para o estímulo aversivo e na outra extremidade o abrigo com cama da caixa moradia com suas respectivas dimensões.	46
Figura 6 –	Ilustração do aparato utilizado no teste de suspensão pela cauda com suas respectivas dimensões.	47
Figura 7 –	Ilustração do aparato do teste do nado forçado com sua respectiva dimensão.....	48
Figura 8 –	Escores obtidos após análise dos parâmetros do sistema sensorial no teste do campo aberto, dos camundongos bate palmas (n=15) e BALB/c (n=15), de ambos os grupos, durante a sessão de 5 minutos. A- irritabilidade; B- reflexo auricular; C- aperto de cauda; D-reflexo corneal; E- resposta ao toque. São apresentadas as médias e respectivos erros-padrão. Anova de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. * $P < 0.05$ em relação ao respectivo grupo BALB/c de mesmo sexo. *** $p < 0,001$ relativo ao sexo.....	52
Figura 9 –	Escores obtidos após análise dos parâmetros do sistema psicomotor no teste do campo aberto, dos camundongos bate palmas (n=15) e BALB/c (n=15), de ambos os grupos, durante a sessão de 5 minutos de camundongos bate palmas (n=15) e BALB/c (n=15).A- reflexo de endireitamento; B- queda do trem posterior. Anova de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni para o reflexo de endireitamento, ** em relação ao respectivo grupo controle; Teste t de Student para queda do trem posterior, ** $p < 0,01$ em relação ao respectivo grupo controle	54
Figura 10 –	Atividade geral observada em campo aberto observada durante 5 minutos de camundongos bate palmas (n=15) e BALB/c (n=15).A- Tempo total de locomoção B- Frequência de levantar; C- Frequência de limpeza;D- duração em minutos de limpeza. São apresentadas as médias e respectivos erros-padrão. Anova de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. * $P < 0.05$ em relação ao respectivo grupo BALB/c de mesmo sexo.....	56
Figura 11 –	Avaliação dos parâmetros do sistema nervoso autônomo dos camundongos bate palmas (n=15) e BALB/c (n=15). A- Frequência de micção; B- Frequência de defecação. São apresentadas as médias e respectivos erros-padrão. Anova de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. *** $P < 0.05$ em relação ao sexo.....	57
Figura 12 –	Avaliação dos parâmetros no labirinto em cruz elevado de camundongos bate palmas (n=15) e BALB/c (n=15). São apresentadas as médias e respectivos erros-padrão. Anova de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. ** $P < 0.05$ em	

relação ao grupo controle. As barras mostram diferenças significativa entre os sexos	59
Figura 13 – Comportamento de camundongos bate palmas (machos: n=13, fêmeas: n=14) e BALB/c (machos: n=13, fêmeas: n=14), no teste de alternância espontânea do labirinto em T. Os dados são apresentados como médias e respectivos erros padrão. Anova de duas vias.....	60
Figura 14 – Avaliação dos camundongos bate palmas (n=15) e BALB/c (n=15) no teste de coordenação motora observada em trave elevada. São apresentadas as médias e respectivos erros padrão. A barra representa diferença estatística entre sexos. ANOVA de duas vias seguida pelo teste pelo teste de Bonferroni.* $p < 0,05$	61
Figura 15 – Avaliação dos parâmetros no teste de suspensão pela cauda de camundongos bate palmas (n=15) e BALB/c (n=15). São apresentadas as médias e respectivos erros-padrão. Anova de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. ** $P < 0.05$ em relação ao grupo controle. As barras mostram diferenças significativa entre os sexos	62
Figura 16 – Avaliação dos parâmetros no teste de natação forçada de camundongos bate palmas (n=15) e BALB/c (n=15). São apresentadas as médias e respectivos erros-padrão. Anova de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. ** $P < 0.05$ em relação ao grupo controle. As barras mostram diferenças significativa entre os sexos	64

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Parâmetros da atividade geral e sensorial: descrição dos sinais observados e valores de escores. O valor base é apresentado pelo animal do grupo controle ...	39
Quadro 2 –	Parâmetros psicomotores: descrição dos sinais observados e valores de escores. O valor base é apresentado pelo animal do grupo controle.....	40
Quadro 3 –	Parâmetros do sistema nervoso central e autônomo: descrição dos sinais observados e valores de escores. O valor base é apresentado pelo animal do grupo controle.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Dados estatísticos do teste da ANOVA de duas vias referentes aos testes comportamentais empregados para a caracterização fenotípica do camundongo mutante bate palmas (n=15/sexo), comparado com seu controle BALB/c (n=15/sexo).SD- sem diferenças	65
------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
bapa	<i>bate palmas</i>
CAPES	Coodenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ENU	N-ethyl-N-nitrosourea
EPM	Erro padrão da média
G1	Primeira geração
G2	Segunda geração
G3	Terceira geração
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
KMT2D	Lysine (K)- Specific Methyltransferase 2D
mg	miligrama
MLL2	Mixed- Lineage Leukemia 2
MLL4	Mixed- Lineage Leukemia 4
NEBA	Número de entradas nos braços abertos
NEBF	Número de entradas nos braços fechados
SNPs	Single Nucleotide Polymorphism
SNV	Single Nucleotide Variant
SK	Síndrome de Kabuki
TPBA	Tempo de permanência nos braços abertos
TPBF	Tempo de permanência nos braços fechados

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	24
2	OBJETIVOS	32
2.1	Objetivo geral	32
2.2	Objetivos específicos	32
3	MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1	Animais	34
3.2	Delineamento experimental	35
3.2.1	Teste de campo aberto	37
3.2.2	Teste do labirinto em cruz elevada.....	42
3.2.3	Teste de alternância do labirinto em T	43
3.2.4	Teste de coordenação motora em trave elevada.....	45
3.2.5	Teste de suspensão pela cauda.....	46
3.2.6	Teste de natação forçada	47
3.3	Análise estatística	49
4	RESULTADOS	51
4.1	Análise da atividade geral em campo aberto	51
4.1.1	Parâmetros do sistema sensorial.....	51
4.1.2	Parâmetros ligados ao sistema psicomotor	53
4.1.3	Atividade geral em campo aberto.....	55
4.1.4	Parâmetros ligados ao sistema nervoso autônomo	57
4.2	Teste do labirinto em cruz elevada.....	57
4.3	Teste do labirinto em T	60
4.4	Teste de coordenação motora em trave elevada.....	60
4.5	Teste de suspensão pela cauda	61
4.6	Teste de natação forçado	63
5	DISCUSSÃO	68
6	CONCLUSÃO	75
7	REFERÊNCIAS	77

1. INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O camundongo (*Mus Musculus*) de laboratório é amplamente reconhecido como o modelo animal mais importante na investigação de componentes genéticos e celulares que são relevantes para o entendimento de processos fisiológicos e patológicos tanto em seres humanos como também em outras espécies animais. Esses animais são excelentes modelos biológicos para doenças humanas, uma vez que são fáceis de serem manipulados, possuem gestação curta (aproximadamente 21 dias) e podem ser criados em espaços pequenos. Assim, um enorme arsenal de ferramentas está disponível para a realização de estudos experimentais em genética de camundongos, incluindo: a grande diversidade de linhagens isogênicas; o sequenciamento completo do genoma da linhagem C57BL/6 (além do sequenciamento parcial do genoma de dezenas de outras linhagens isogênicas); a disponibilidade de mapas genéticos das variações do genoma (Single Nucleotide Polymorphisms – SNPs) e a tecnologia para a manipulação direta e específica do genoma do camundongo (BULT et al., 2013; ADAMS et al., 2015).

Conhecendo o potencial do camundongo como modelo animal de estudo para os processos biológicos em seres humanos, elucidar a relação entre as mutações e as doenças depende, em parte, de integrar os diversos dados genéticos, a genômica e as informações disponíveis sobre o fenótipo dessa espécie animal, promovendo a investigação experimental e translacional (BULT et al., 2013). Pesquisadores ligados ao projeto “Mouse Genome Sequencing Consortium” publicaram em 2002 o sequenciamento em alta resolução do genoma do camundongo da linhagem C57BL/6J. A análise desse sequenciamento demonstrou que cerca de 40% do genoma do camundongo e do ser humano podem ser diretamente alinhados e que aproximadamente 80% dos genes humanos possuem um gene correspondente no genoma do camundongo. Aproximadamente 99% dos genes do camundongo possuem um gene homólogo no genoma humano e 96% dos genes ortólogos situam-se dentro de um intervalo semelhante e conservado no genoma humano (GUENET, 2005; ADAMS et al., 2015).

Atualmente, mais de quatro mil mutações espontâneas, induzidas por radiação ou agentes químicos, têm sido identificadas no genoma do camundongo.

Estas mutações são expressas em uma grande variedade de fenótipos, tais como: defeito no esqueleto ou tecido ósseo, alterações na pele ou apêndices, disfunções neuromusculares, doenças hormonais ou metabólicas, defeitos nos olhos, disfunções auditivas, anemias de vários tipos e hemoglobinopatias, alterações neurológicas, alterações comportamentais e neurodegenerativas e efeitos pleiotrópicos, ou seja, quando um único gene atua em mais de uma característica do fenótipo (International Mouse Strain Resource [IMSR]. Disponível em: <http://www.findmice.org/>).

Apesar da importância das mutações espontâneas no estudo de doenças genéticas, essas ocorrerem em baixa frequência em camundongos ($\sim 5 \times 10^{-6}$ por locus), levando os geneticistas de camundongos a buscarem agentes mutagênicos para gerar novas mutações de maneira mais eficiente (RUSSELL et al., 1989). Um dos agentes químicos mais utilizados para induzir mutações em camundongos é o N-ethyl-N-nitrosourea (ENU), fórmula química $C_3H_7N_3O_2$. O ENU é um composto que causa mutações pontuais ao acaso por troca de uma única base nitrogenada pela alquilação direta dos ácidos nucleicos (Justice et al. 1999). O grupo ethyl do ENU pode ser transferido para radicais de oxigênio ou de nitrogênio em vários sítios reativos da molécula de DNA. O grupo ethyl sozinho não constitui uma mutação, porém sua presença pode causar erro na identidade da base etilada durante a replicação do DNA, que pode resultar em erro no pareamento das bases nitrogenadas, e dessa maneira ocorrerem as mutações pontuais; no entanto eventualmente também podem ocorrer pequenas deleções (SHIBUYA; MORIMOTO, 1993; JUSTICE, 2000).

O protocolo de mutagênese em camundongos, utilizando o ENU, é realizado injetando-se o agente químico por via intraperitoneal em camundongos machos, com o intuito de induzir mutações nas espermatogônias. Depois do tratamento, esses camundongos passam por um período de esterilidade, sendo que as espermatogônias mutadas repovoam os testículos para produzir clones de espermatozóides mutados. As mutações mais comumente observadas são as transições AT para TA ou as transições AT para GC. A taxa de mutação observada depende da dose administrada de ENU e da linhagem de camundongo tratada (JUSTICE, 2000).

O camundongo mutante recessivo denominado de *bate palmas* (*bapa*) originou-se de um projeto de mutagênese química coordenado pela Dra. Sílvia Maria Gomes Massironi, no Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Imunologia, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP). As mutações foram induzidas utilizando o agente químico ENU, durante a execução de um projeto colaborativo entre o Biotério do Departamento de Imunologia do ICB/USP, o Departamento de Genética do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais e o Instituto Pasteur de Paris da França (MASSIRONI et al., 2006). Resumidamente, as mutações foram obtidas após o tratamento de camundongos BALB/c machos com o agente mutagênico ENU. Esses animais receberam doses múltiplas de ENU (100mg/kg, por via intraperitoneal), semanalmente, durante 4 semanas. Depois do tratamento os machos tiveram um período de esterilidade (aproximadamente 20 semanas, devido à depleção de espermatogônias nos testículos); após esse intervalo, esses machos foram acasalados com fêmeas BALB/c não tratadas. A geração G1 desse cruzamento foi observada para mutações dominantes. Um protocolo de cruzamentos de três gerações foi utilizado para recuperar as mutações recessivas. Os machos G1 que não portavam mutações dominantes foram então acasalados com fêmeas isogênicas BALB/c e, finalmente, acasalados com suas filhas (G2). Após esses cruzamentos, a maior parte das mutações recessivas encontrava-se em homozigose podendo ser observadas na geração G3. Os “pedigrees”, nos quais as mutações recessivas foram identificadas, tornaram-se objetos de novos cruzamentos para a manutenção das novas linhagens mutantes em estado totalmente isogênico (MASSIRONI et al., 2006).

Os camundongos mutantes foram observados visualmente e anotados quanto aos parâmetros relacionados com a formação do esqueleto, pelagem, olhos, orelhas, comportamentos patológicos, reações, crescimento, anemia, sinais de doenças neurológicas, mortalidade, entre outros. O mutante *bate palmas* apresentou movimento anormal dos membros posteriores quando levantado pela cauda, simulando a ação de bater palmas. Essa alteração postural sugere deficiência na coordenação motora do camundongo mutante. Por meio de acasalamentos e pela observação da prole, o modo de herança da mutação foi identificado como sendo autossômico recessivo (MASSIRONI et al., 2006).

Inicialmente o mapeamento genético foi realizado por PCR utilizando-se um painel de 54 marcadores moleculares do tipo microssatélite, polimórficos entre as linhagens parentais, distribuídos pelo genoma do camundongo (abrangendo os 19 cromossomos autossômicos), conforme descrito por (MASSIRONI et al., 2006). Esses resultados indicaram que o gene responsável pela mutação estava localizado no cromossomo 15 do camundongo. A técnica de sequenciamento do exoma identificou um único SNV (Single Nucleotide Variant) candidato no gene lysine (K)-specific methyltransferase 2D (*kmt2d*), localizado no cromossomo 15 do camundongo, descrito na literatura como responsável pela síndrome de Kabuki em humanos (MIYAKE et al., 2013); BÖGERSHAUSEN et al., 2016). O sequenciamento pelo método de Sanger demonstrou uma troca T/C no transcrito (cA3865G:p.T1289A) localizada no exon 13. Os resultados do sequenciamento sugeriram uma forte evidência da presença do alelo em homozigose na população mutante (comunicação pessoal).¹

Mutações com perda de função no gene KMT2D (também conhecido como MLL2 ou MLL4) localizado no cromossomo 12 ou no gene KDM6A (lysine (K)-specific demethylase 6A), localizado no cromossomo X de humanos, foram descritas causando a síndrome de Kabuki, uma anomalia congênita rara, autossômica dominante, também conhecida como síndrome Niikawa-Koruki (MICALE et al., 2011).

A síndrome de Kabuki foi descrita pela primeira vez no ano de 1981 por dois pesquisadores, Niikawa e Kuroki, cujas publicações relataram os sinais clínicos de crianças portadoras dessa síndrome; no entanto, na época a etiologia da doença ainda não era conhecida (NIIKAWA et al., 1981; KUROKI et al., 1981; KUROKI; KATSUMATA; EGUCHI, 1987; NIIKAWA et al., 1988). O fenótipo clínico da doença é muito variável, mas algumas características como face dismórfica, anormalidades esqueléticas - incluindo braquidactilia do quinto dedo e/ou vertebra deformada-, alterações dermatoglíficas, leve a moderado retardo mental, retardo do crescimento pós-natal, suscetibilidade a infecções na infância e baixa estatura podem ser identificadas (MAKRYTHANASIS et al., 2013; BJORNSSON et al., 2014).

Além das características citadas acima, foram relatadas em pacientes com a síndrome de Kabuki outras alterações tais como anomalias do trato geniturinário,

¹ Informação fornecida pelo Tiago Antônio Souza, em maio de 2017.

defeitos no coração e intestino, além disso, alguns dos casos apresentaram dentição anormal, alterações otológicas e oftalmológicas; em outros se observou a ocorrência de convulsões e anomalias no sistema endócrino (NIIKAWA et al., 1987; WESSELS et al., 2002; MICALE et al., 2011). Vários relatos de casos apresentaram também alterações na coluna vertebra como escoliose, defeitos nas mãos como as epífises em formato de cone, brachidactilia e clinodactilia, além de luxação do quadril (Niikawa et al. 1988; WESSELS et al., 2002). De acordo com (VAN LAARHOVEN et al., 2015), diferentes aspectos craniofaciais observados na síndrome de Kabuki devem-se principalmente a diminuição da expressão do gene KMT2D e KDM6A durante a fase de desenvolvimento do embrião.

Ambos os genes, KMT2D e KDM6A, estão relacionados com o processo de metilação de histonas, facilitando a abertura da cromatina e promovendo a expressão gênica. O gene KMT2D é uma metil-transferase que promove a trimetilação da histona H3 lisina K4 (H3K4me3, sinaliza a abertura da cromatina), enquanto o gene KDM6A é uma demetil-transferase que remove a trimetilação da histona H3 lisina K27 (H3K27me3, sinaliza o fechamento da cromatina) (BJORNSSON et al., 2014). Nesse contexto, é provável que o desequilíbrio na abertura da cromatina tenha um papel crucial na patogenia da síndrome de Kabuki (MIYAKE et al., 2013).

A etiologia da síndrome de Kabuki é bastante complexa. O gene KMT2D codifica uma histona metiltransferase que regula a ativação de um conjunto de genes, que após a sua transcrição, são responsáveis pelo processo de embriogênese e o desenvolvimento do embrião nas suas fases iniciais (SANTOS et al 2013). Normalmente, no processo de patogênese da síndrome de Kabuki a di- e tri-metilação da histona H3 lisina 4 (H3K4) estão associadas com a transcrição ativa de um conjunto de genes, ao mesmo tempo que a di- e tri-metilação da H3K27 estão associados com o silenciamento da expressão desses genes (SANTOS et al., 2013). Na genética podemos caracterizar a metilação de histonas como um processo epigenético no qual a expressão de diferentes genes é regulada em estágios distintos. Dependendo da posição dos resíduos de Lisina, os mecanismos de mono-, di- ou tri-metilação da lisina na histona irá resultar em ativação ou desativação da transcrição desses genes (MICALE et al., 2011). Inicialmente, o diagnóstico da síndrome de Kabuki é baseado nos sinais clínicos apresentados pelos humanos. O

diagnóstico molecular já é usado e constitui um item importante para identificar as possíveis mutações que podem ser consideradas na doença. O diagnóstico precoce por técnicas moleculares, bem como a identificação da mutação, auxiliam não somente no diagnóstico da doença após o nascimento, mas também no diagnóstico pré-natal e, conseqüentemente, possibilitam o aconselhamento genético antes da pré-implantação do embrião nos casos de fertilização in vitro. (SANTOS et al., 2013).

Existem poucos modelos animais descritos na literatura para estudo da síndrome de Kabuki. Uma publicação recente descreve o modelo murino *kmt2d*^{+/ β Geo}, também conhecido como *mll2*^{Gt(RRt024)Byg} que apresenta alteração na neurogênese e déficit de memória relacionada ao hipocampo; como também má-formação craniofacial compatível com a anomalia em humanos (BJORNSSON et al., 2014). BENJAMIN et al.(2017) relataram que uma dieta cetogênica foi capaz de modular as histonas H3ac e H3K4me3 na camada de células granulares do hipocampo, com recuperação concomitante da neurogênese e das anormalidades de memória observadas nos camundongos *kmt2d*^{+/ β Geo}. Outros modelos em camundongos com perda de função de um alelo para o gene *kmt2a* (*mll1*) e *kmt2b* (*mll2*) também demonstraram déficit na aprendizagem e memória relacionada ao hipocampo, alterações na plasticidade sináptica e defeitos na neurogênese, sugerindo que os dois genes possuem funções redundantes no hipocampo (KERIMOGLU et al., 2013; SHEN et al., 2014; JAKOVCEVSKI et al., 2015).

Em 2015, Van laarhoven et al. (2015)desenvolveram um modelo de estudo para a síndrome de Kabuki em zebrafish, no intuito de esclarecer as funções dos genes *kmt2d* e *kdm6a*. Nesse modelo analisou-se o desenvolvimento de anormalidades em tecidos englobando estruturas craniofaciais, coração e cérebro relacionando-as com as anormalidades encontradas nos pacientes com síndrome de Kabuki. Enquanto os mutantes *kmt2d* apresentaram anomalias na maioria das estruturas analisadas, os mutantes *kdm6a* e *kdm6al* apresentaram irregularidades cerebrais e fenótipos craniofaciais semelhantes aos pacientes com síndrome de Kabuki. Já os mutantes *kdm6al* apresentaram alterações cardíacas mais relevantes quando comparados com os mutantes *kdm6a*. Esse trabalho reforçou as evidências da função direta dos genes *kmt2d* e *kdm6a* no desenvolvimento dos órgãos e tecidos em pacientes que são afetados pela síndrome de Kabuki (VAN LAARHOVEN et al., 2015).

Em síntese, a técnica de sequenciamento do exoma do camundongo mutante *bapa* identificou como forte candidato uma mutação no gene *kmt2d*, descrito como responsável pela síndrome de Kabuki em humanos. A confirmação da mutação foi feita pelo método de Sanger e demonstrar sua função é o objeto deste trabalho. Para tanto, serão realizados estudos comportamentais e exames radiográficos para caracterização do fenótipo, visando à validação como possível modelo animal para estudos relacionados à mutação do gene *kmt2d*, que tem como sua principal manifestação a síndrome de Kabuki.

2. OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo caracterizar o fenótipo dos camundongos mutantes *bate palmas*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar por meio da observação direta em campo aberto os parâmetros da atividade geral, sensoriais, psicomotores e os parâmetros ligados ao sistema nervoso central e autônomo de camundongos BALB/c^{bapa} e compará-los aos de camundongos BALB/c controles;
- 2) Avaliar a ansiedade e a memória dos camundongos mutantes *bate palmas* pelo teste do labirinto em cruz elevada;
- 3) Avaliar a memória operacional dos camundongos mutantes *bate palmas* pelo teste da alternância espontânea em labirinto em T.
- 4) Avaliar a coordenação motora de camundongos BALB/c^{bapa} no teste da trave elevada e compara-los aos camundongos BALB/c;
- 5) Avaliar o comportamento tipo depressivo pelo teste do nado forçado e de suspensão pela cauda.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

No presente estudo foram utilizados 60 camundongos, mutantes bate palmas e seus controles BALB/c, provenientes do biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB|USP). Para a realização dos experimentos os animais foram alojados no Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) e permaneceram por um período de pelo menos 10 dias de adaptação antes do início dos testes. Todos os camundongos foram alojados em gaiolas moradias de polipropileno (30 cm x 20 cm x 13 cm), forradas com cama de granulado de sabugo de milho (*Zea mays*) autoclavado, trocada semanalmente.

As fêmeas foram alojadas em número de três ou quatro animais por gaiola. Já os machos foram alojados individualmente para evitar brigas e foi introduzida na gaiola uma fêmea BALB/c que não participou do experimento, com o intuito de evitar o estresse pelo isolamento. Os animais foram mantidos em estantes com ciclos de claro/escuro de 12 horas, umidade relativa do ar entre 45 e 55%, temperatura de 22 ± 2 °C e 20 trocas de ar por hora. Ração comercial para camundongos (Nuvilab CR1, Quimtia S.A., Paraná, Brasil) e água filtrada e autoclavada foram oferecidas *ad libitum* durante todo o procedimento experimental. Foram realizadas as higienizações das gaiolas semanalmente, sempre nos mesmos horários.

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da FMVZ/USP sob protocolo de número: 1004070715

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Cada grupo experimental era composto por camundongos machos e fêmeas com 2 meses de idade no início dos experimentos, sendo os mutantes BALB/c^{bapa} machos (n=15) e fêmeas (n= 15) induzidos por ENU e seus controles BALB/c machos (n=15) fêmeas (n=15).

O comportamento normal dos animais foi avaliado na rotina diária, principalmente durante as higienizações, atentando-se ao aparecimento de sinais de agressão como brigas e mordidas.

Os testes comportamentais foram realizados em salas de experimentação do Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ/USP, sempre no mesmo horário e pelo mesmo experimentador, sendo respeitado o intervalo mínimo de cinco dias entre um teste e outro, – e ordenados pelo nível de estresse que causam aos animais para que a realização de um teste não influencie na realização do seguinte (figura 1). Após cada camundongo ter concluído o teste, os aparelhos foram limpos com solução de etanol a 5% para que o odor de um animal não influenciasse na resposta do animal seguinte. Todos os testes foram filmados e posteriormente os vídeos foram sistematicamente analisados por dois observadores de acordo com os parâmetros predefinidos, com auxílio dos programas OpenFLD.Ink (disponível em <http://blog.sbnec.org.br/2010/07/software-gratuitos-para-analise-do-labirinto-em-cruz-elevado-e-campo-aberto/>, no dia 21 de Out. de 2016) e PlusMZ (disponível em <http://blog.sbnec.org.br/2010/07/software-gratuitos-para-analise-do-labirinto-em-cruz-elevado-e-campo-aberto/>, no dia 21 de Out. de 2016).

Figura 1 - Sequência dos testes comportamentais utilizados para a fenotipagem dos camundongos mutantes *bate palmas*.

Fonte: OLIVEIRA, 2017.

3.2.1 Teste de Campo Aberto

O teste do campo aberto foi realizado com o objetivo de observar a atividade geral dos camundongos caracterizando de forma quantitativa e qualitativa os parâmetros exploratórios e motores no campo aberto. A metodologia utilizada neste teste foi adaptada a partir de Yoshizaki et al. (2016). Resumidamente, o teste do campo aberto consiste em confrontar o animal com a novidade do ambiente. Para tanto, utilizou-se uma arena circular de cor preta com 40 cm de diâmetro e parede lateral com 50 cm de altura (figura 2). Cada animal foi colocado no centro do aparelho e os seguintes comportamentos foram registrados durante o tempo total de 5 minutos: tempo de locomoção (em segundos) no qual o animal percorreu a arena do campo aberto, frequência de levantar e número de vezes que o camundongo realizou a autolimpeza (grooming). Em seguida, os parâmetros comportamentais foram analisados na seguinte sequência: 1) atividade geral e sistema sensorial: frêmito vocal, irritabilidade, reflexo auricular, aperto de cauda, reflexo corneal e resposta ao toque; 2) testes psicomotores: contorção, trem posterior, reflexo de endireitamento, tônus corporal e força de agarrar; 3) avaliação do sistema nervoso central e autônomo: tremores, convulsões, cauda em pé, sedação, anestesia, ataxia, ptose, lacrimação, micção e defecação. Os escores atribuídos para cada parâmetro são apresentados nos quadros 1, 2 e 3. O tempo total de locomoção, o número de vezes de levantar, o número e o total de tempo do grooming foram interpretadas pelo *software* OpenFLD. INK (Disponível em: <http://blog.sbnec.org.br/2010/07/software-gratuitos-para-analise-do-labirinto-em-cruz-elevado-e-campo-aberto/>, acesso em 30. Maio. 2017, às 14h).

Figura 2 - Ilustração da arena do campo aberto (visto de cima) com sua respectiva dimensão.

Fonte: OLIVEIRA, 2017.

Quadro 1- Parâmetros da atividade geral e sensorial: descrição dos sinais observados e valores de escores. O valor base é apresentado pelo animal do grupo controle.

Função	Parâmetro	Descrição dos sinais observados	Escores atribuídos
ATIVIDADE	Atividade Geral	Verificar a atividade geral do animal na gaiola moradia após estímulo. Entende-se como atividade geral, dentre outros comportamentos a presença de locomoção, levantar, farejar e/ou parado.	0 – não se move 1- animal dá um passo 2 – animal dá meia volta na caixa de observação 3 – animal dá duas voltas na caixa (base) 4- animal andando com agilidade
SISTEMA SENSORIAL	Frêmito Vocal	Observar se há emissão de som sem nenhuma estimulação ou toque,	0 – ausente 4 - presente
	Irritabilidade	Assoprar o animal e tocá-lo levemente para observar reação.	0 – ausente 4 - presente
	Reflexo Auricular	Observar a posição da orelha, quanto mais próxima da cabeça, menor é o reflexo. Estalar um dos dedos uma vez e analisar o reflexo. Logo após estalar várias vezes seguidas e observar reflexos.	0 - orelha totalmente em pé (ausente) 1- orelha um pouco mais em pé (base) 2 - orelha metade em pé 3 - orelha colada ligeiramente na cabeça 4 - orelha colada à cabeça.
	Aperto de Cauda	Apertar com uma pinça a região próxima a ponta da cauda com bastante intensidade	0 – sem reação 1 – move-se ligeiramente 2 – se move mais rápido 3 – se move e pula (base) 4 – se move, pula e corre
	Reflexo Corneal	Aproximar uma pinça, lentamente, até os olhos do animal, sem encostá-la, e verificar se o animal tem o reflexo de fechá-los.	0 - olhos permanecem abertos 1 - quase não se move 2 - se move um pouco 3 - fecha os olhos pela metade na aproximação da pinça.
	Resposta ao Toque	Tocar o animal com uma pinça a um intervalo de tempo mais prolongado (mais de 15 segundos) e examinar a resposta.	0 - não se move 1 - apresenta pouco movimento 2 - animal dá um passo 3 - anda com dificuldade 4 - andar com agilidade (base).

Quadro 2- Parâmetros psicomotores: descrição dos sinais observados e valores de escores. O valor base é apresentado pelo animal do grupo controle.

Função	Parâmetro	Descrição dos sinais observados	Escores atribuídos
PSICOMOTORA	Contorção	Movimento vermiforme do corpo.	0 – ausência (base) 4 - presente
	Trem Posterior	Verificar se o animal está com a postura normal ou se o trem posterior está caído (intensidade, modo de andar).	0 - ausente (base) 1 - queda do trem posterior pouco visível 2 - queda do trem posterior visível, animal anda com dificuldade 3 - trem posterior visivelmente caído, animal anda com dificuldade 4 - trem totalmente caído, animal anda com dificuldade, arrastando o trem posterior.
	Reflexo de Endireitamento	Colocar o animal com o dorso para baixo e verificar a latência com que o animal volta a sua posição normal em até 15 segundos.	0 - não se move 1 - volta-se lentamente com dificuldade 2 - volta-se lentamente 3 - volta-se mais rápido 4 - volta-se imediatamente com agilidade (base)
	Tônus Corporal	Verificar sua presença ou não e o grau do mesmo.	0 – ausente 4 – presente (base)
	Força de Agarrar	Colocar o animal em cima de uma grade e avaliar a intensidade em que se segura na mesma.	0 - não se agarra à grade 1 - segura inicialmente e larga a grade 2 - segura a grade, por um tempo mais prolongado, mas a solta 3 - segura firmemente a grade, mas solta 4 - segura firmemente a grade e não a solta (base).

Quadro 3- Parâmetros do sistema nervoso central e autônomo: descrição dos sinais observados e valores de escores. O valor base é apresentado pelo animal do grupo controle.

Função	Parâmetro	Descrição do Parâmetro	Escores atribuídos
SISTEMA NERVOSO CENTRAL	Tremores	Observar se estão presentes ou não e qual a intensidade.	0 – ausente (base) 4 – presente
	Convulsões	Observar a presença ou não.	0 – ausente (base) 4 – presente
	Cauda em pé	Verificar se a cauda está normal ou ereta.	0 – normal (base) 4 - ereta
	Sedação	Animal quieto, sem movimento, mas se tocado responde ao estímulo e abre os olhos.	0 – ausente (base) 4 – presente
	Anestesia	Ausência de resposta ao estímulo doloroso com perda do reflexo de endireitamento.	0 – ausente (base) 4 – presente
	Ataxia	Movimentos incoordenados devido a dismetria (distúrbio de coordenação dos movimentos por estados de inconsciência e consciência compensatória)	0 – ausente (base) 4 – presente
SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO	Ptose	Olho fechado ou semifechado mesmo após um estímulo. O animal se locomove ou não, mas continua com as pálpebras caídas.	0 - ausente (base) 1 - olho ligeiramente fechado 2 - olho um pouco mais fechado 3 - olho fechado pela metade 4 - olho quase totalmente fechado.
	Lacrimação	Presença e grau.	0 – ausente (base) 4 – presente
	Micção	Número de micções.	Número de poças de urina
	Defecação	Número de bolos fecais.	Número de cibalas

3.2.2 Teste do Labirinto em Cruz Elevada

Este teste foi validado em 1990 por Lister para avaliação da ansiedade em camundongos frente a um espaço aberto. O aparato consiste em um labirinto confeccionado em madeira com revestimento de tinta óleo cinza escuro e possui dois braços abertos e dois braços fechados com paredes laterais, do mesmo tamanho (30 cm de comprimento e 16 cm de altura nos braços fechados). Os braços abertos e fechados, elevados 50 cm do solo, cruzam-se perpendicularmente formando uma cruz (figura 3). O protocolo do teste foi adaptado conforme descrito na literatura. Przybyla et al. (2016). No primeiro dia do teste cada camundongo foi posicionado na plataforma central com a cabeça voltada para o braço aberto e observado durante 3 minutos. Após 24 horas os mesmos animais passaram por uma nova sessão de 3 minutos no labirinto para a evocação da memória aversiva espacial.

Como indicativo da avaliação do comportamento foram registrados os seguintes parâmetros:

1. Número de entradas nos braços abertos (NEBA): corresponde ao ato do animal entrar nos braços abertos com as quatro patas.
2. Número de entradas nos braços fechados (NEBF): corresponde ao ato do animal entrar nos braços fechados com as quatro patas.
3. Tempo de permanência nos braços abertos (TPBA).
4. Tempo de permanência nos braços fechados (TPBF).
5. Análise de risco: movimento exploratório nos braços abertos no qual o animal estica o corpo e a cabeça olhando para baixo.

Figura 3 - Ilustração do labirinto em cruz elevado subdividido em área central, braços abertos, braços fechados com suas respectivas dimensões.

Fonte: OLIVEIRA, 2017.

3.2.3. Teste de alternância espontânea no labirinto em T

O teste de alternância espontânea no labirinto em T foi utilizado como ferramenta para avaliar a memória operacional dos camundongos mutantes. O protocolo foi adaptado do estudo realizado por Kirsten et al. (2015). Os animais foram colocados individualmente em um labirinto em T, no qual cada braço do T tem 25 cm de comprimento e 14 cm de altura. O labirinto era elevado a uma altura de 50 cm do chão (figura 4). Os braços do labirinto foram nomeados individualmente (A, B e C). No início de cada braço existia uma comporta que isola o braço, e pode ser aberta ou fechada durante a execução do teste. Os camundongos foram colocados na base do labirinto (braço A) com a comporta fechada, durante 10 segundos. Após esse tempo a comporta era aberta de forma que o camundongo pudesse explorar o labirinto durante o tempo de 30 segundos. Quando nenhum dos braços (B ou C) foi escolhido o camundongo era recolocado na base do T (braço A) por mais 10 segundos. Caso o camundongo escolhesse um dos braços (B ou C), a comporta era fechada impossibilitando que o mesmo saísse do braço. Depois de decorrido o tempo de 30 segundos no braço escolhido o camundongo era recolocado novamente no braço A por mais 10 segundos para que o procedimento fosse repetido até

que o camundongo tivesse entrado 5 vezes em algum dos braços (B ou C). O parâmetro avaliado foi a frequência de alternância entre os braços esquerdo e direito, sempre com relação ao braço visitado na sessão anterior ao teste. A partir disso, quanto maior o escore de alternâncias entre os braços A e B, mais normal foi considerado o comportamento do animal, e quanto menor for o escore atribuído, maior é a inflexibilidade cognitiva e o comportamento repetitivo. Os escores foram atribuídos da seguinte maneira:

- a) Escore 0: repetição do mesmo braço visitado durante as 5 sessões
- b) Escore 1: uma alternância entre os braços visitados durante as 5 sessões
- c) Escore 2: duas alternâncias entre os braços visitados durante as 5 sessões
- d) Escore 3: três alternâncias entre os braços visitados durante as 5 sessões
- e) Escore 4: quatro alternâncias entre os braços visitados durante as 5 sessões

Figura 4 - Ilustração do Labirinto em T (visto de cima) subdividido em braço A, B e C com sua respectiva dimensão.

Fonte: OLIVEIRA, 2017.

3.2.4 Teste de coordenação motora em Trave Elevada

A coordenação motora foi avaliada no teste da trave elevada. O protocolo foi descrito por KUMAR; JAGGI; SINGH (2014) e adaptado para camundongos em nosso laboratório. O aparato consiste de uma barra de madeira medindo 15 cm de altura por 150 cm de comprimento, que dista 20 cm do chão. Essa trave ficava apoiada em duas bases, sendo estas posicionadas nas suas extremidades (Figura 5). Em uma das extremidades da barra foi posicionado um abrigo com cama da caixa moradia, na outra extremidade foi colocada uma fonte de luz que serviu como estímulo aversivo, para estimular os animais atravessarem a trave, já que camundongos são tipicamente noturnos. Para a avaliação da coordenação motora, no primeiro dia o camundongo foi treinado a andar sobre a trave, que consistia em 3 tentativas de atravessar a barra, com duração de 5 minutos cada tentativa. Inicialmente o camundongo foi colocado na extremidade com a fonte de luz projetada sobre ele e, a partir de então, o tempo foi cronometrado. No fim de cada sessão (tentativa de 5 minutos) o camundongo foi recolocado no início da trave. O mesmo treino foi repetido no dia seguinte, e no terceiro dia foi realizado o teste, no qual foi considerada uma única tentativa de atravessar a trave.

O desempenho dos camundongos na trave foi avaliado através de uma escala de escores, conforme segue:

- a) Escore 1: o camundongo não atravessou a trave.
- b) Escore 2: o camundongo atravessou a trave com 6 falhas ou mais.
- c) Escore 3: o camundongo atravessou a trave com 1 a 5 falhas.
- d) Escore 4: o camundongo atravessou a trave sem falhas.

Figura 5 - Ilustração da trave elevada (visto de lado) com a lâmpada no início utilizada para o estímulo aversivo e na outra extremidade o abrigo com cama da caixa moradia com suas respectivas dimensões.

Fonte: OLIVEIRA, 2017.

3.2.5 Teste de suspensão pela cauda

O protocolo do teste de suspensão pela cauda foi adaptado de acordo com Laureano-Melo et al. (2016) com as condições do nosso laboratório de comportamento animal. O procedimento consistiu em suspender cada camundongo pela cauda e, com o auxílio de uma fita adesiva, fixá-lo em um gancho posicionado dentro de uma caixa de madeira com 3 paredes de dimensões iguais, a qual foi posicionada na bancada a uma altura de aproximadamente 1 metro do chão, de modo que cada animal permanecesse com o corpo voltado para a câmera que registrava o comportamento (figura 6). Cada camundongo permaneceu nessa posição durante 6 minutos. Os parâmetros observados foram: latência para a primeira imobilidade e tempo total de imobilidade. A latência, expressa em segundos, refere-se ao tempo gasto entre o início do teste e o primeiro episódio de imobilidade; o tempo total de imobilidade foi expresso também em segundos e correspondia ao tempo total que o animal permanecia imóvel, ou seja, ausência total de movimentos.

Figura 6 - Ilustração do aparato utilizado no teste de suspensão pela cauda com suas respectivas dimensões.

Fonte: OLIVEIRA, 2017.

3.2.6 Teste de natação forçada

O teste de natação forçada, utilizado para o estudo de medicamentos antidepressivos, foi adaptado em nosso laboratório de acordo com os procedimentos descritos por Laureano-Melo et al. (2016). O teste consiste em colocar o animal para nadar individualmente, em um tanque de plástico transparente contendo água limpa a temperatura de 24°C e uma profundidade de 38 cm, altura 40 cm e largura 29 cm (figura 7). Cada animal permaneceu por 5 minutos no tanque com água, e durante o teste foi avaliado seu comportamento que foi mensurado manualmente. Após o término do teste, cada animal era seco com uma toalha e mantido aquecido com uma lâmpada infravermelha antes de retornarem para sua gaiola moradia. Foi considerado nado quando o animal apresentava grandes movimentos dos membros posteriores deslocando o corpo em todo o cilindro. Já a imobilidade era caracterizada como a falta de movimento de todo o corpo com pequenos

movimentos necessários para manter a cabeça do animal acima da água. Os seguintes parâmetros foram avaliados e mensurados manualmente:

1. Tempo de latência para flutuar pela primeira vez: tempo em segundos até a primeira imobilidade, ou seja, a falta de movimento de todo o corpo;
2. Tempo total de flutuação: tempo em segundos que o animal permaneceu boiando;
3. Número de vezes que o animal mergulhou.

Figura 7 - Ilustração do aparato do teste do nado forçado com sua respectiva dimensão.

Fonte: OLIVEIRA, 2017.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos nos testes comportamentais foram analisados utilizando um software Graphpad Prism versão 5.03 e expressos como média e erro padrão. Utilizou-se o teste ANOVA de duas vias seguido pelo pós- teste de *Bonferroni* para indicar as diferenças entre os grupos. A probabilidade de 5% foi considerada capaz de evidenciar diferenças significantes entre os grupos.

4. Resultados

4. RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DA ATIVIDADE GERAL EM CAMPO ABERTO

4.1.1. Parâmetros do sistema sensorial

A figura 8 ilustra os resultados obtidos da análise dos parâmetros do sistema sensorial observados no campo aberto.

A ANOVA de 2 vias mostrou que a linhagem e o sexo afetaram os resultados com interação entre os mesmos no reflexo auricular (fig.08 B). O teste *post-hoc* indicou que os machos *bate palmas* apresentaram menor reflexo que os BALB/c. Além disto, as fêmeas dos dois grupos tiveram menor níveis deste reflexo que os machos.

No caso do aperto de cauda (fig.08 C), as fêmeas do grupo *bate palmas* apresentaram menor resposta que seu grupo controle não havendo diferenças entre os machos. Além disto, as fêmeas apresentaram maior resposta que os machos.

Nenhuma alteração foi observada com relação ao sexo e linhagem na irritabilidade (fig.08 A), resposta ao toque (fig.08 E) e reflexo corneal (fig.08 D) entre os grupos. Os dados da estatística são mostrados na tabela 1

Figura 8 - Escores obtidos após análise dos parâmetros do sistema sensorial no teste do campo aberto, dos camundongos bate palmas (n=15) e BALB/c (n=15), de ambos os grupos, durante a sessão de 5 minutos. A- irritabilidade; B- reflexo auricular; C- aperto de cauda; D-reflexo corneal; E- resposta ao toque. São apresentadas as médias e respectivos erros-padrão. Anova de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. * $P < 0.05$ em relação ao respectivo grupo BALB/c de mesmo sexo. *** $p < 0,001$ relativo ao sexo.

Fonte: OLIVEIRA, 2017.

4.1.2 Parâmetros ligados ao sistema psicomotor

A figura 9 ilustra os resultados relacionados aos parâmetros do sistema psicomotor. No parâmetro reflexo de endireitamento (fig.09 A) foi detectada diferença estatística em relação as linhagens em que as fêmeas mostraram menores escores que os machos. Quanto à queda do trem posterior observou-se um aumento significativo da queda do trem posterior dos camundongos machos *bate palmas* em relação aos controles BALB/c. Já as fêmeas não apresentaram diferenças, apresentando escore 0 (fig.09 B). No que concerne aos parâmetros contorção, tônus muscular e força de agarrar, ambos os grupos (machos e fêmeas) apresentaram escores máximos indicando que esses animais encontram-se na faixa de normalidade para a espécie. Os dados da estatística são mostrados na tabela 1.

Figura 9 - Escores obtidos após análise dos parâmetros do sistema psicomotor no teste do campo aberto, dos camundongos bate palmas (n=15) e BALB/c (n=15), de ambos os grupos, durante a sessão de 5 minutos de camundongos bate palmas (n=15) e BALB/c (n=15). A- reflexo de endireitamento; B- queda do trem posterior. Anova de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni para o reflexo de endireitamento, ** em relação ao respectivo grupo controle; Teste t de Student para queda do trem posterior, **p< 0,01 em relação ao respectivo grupo controle.

Fonte: OLIVEIRA, 2017.

4.1.3. Atividade geral em campo aberto

A figura 10 mostra os resultados da atividade geral de camundongos (machos e fêmeas) de ambos os grupos experimentais. Na análise do tempo de Locomoção (fig.10 A) a ANOVA de duas vias seguida pelo pós- teste de *Bonferroni* mostrou que não houve interação nos fatores sexo e linhagem. Já na frequência de levantar (fig.10 B) houve diferença estatística no fator linhagem, mas não no fator sexo e na interação entre os fatores linhagem e sexo. Quanto à análise da frequência de limpeza (fig.10 C) a ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de *Bonferroni* mostrou existir diferença estatística no fator linhagem, em que os camundongos machos do grupo experimental apresentaram maior frequência no parâmetro em relação ao seu respectivo grupo controle; não houve diferenças estatísticas significativas entre os sexos e na interação entre os fatores linhagem e sexo. Em referência a análise do tempo total de limpeza (fig.10 D) não houve diferença estatística no fator sexo e linhagem sem interação entre os fatores linhagem e sexo. Os dados da estatística são mostrados na tabela 1.

Figura 10 - Atividade geral observada em campo aberto observada durante 5 minutos de camundongos bate palmas (n=15) e BALB/c (n=15). A- Tempo total de locomoção B- Frequência de levantar; C- Frequência de limpeza; D- duração em minutos de limpeza. São apresentadas as médias e respectivos erros-padrão. Anova de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. * $P < 0.05$ em relação ao respectivo grupo BALB/c de mesmo sexo.

Atividade geral

Fonte: OLIVEIRA, 2017.

4.1.4. Parâmetros ligados ao sistema nervoso autônomo

A Figura 11 ilustra os resultados obtidos na avaliação do sistema nervoso autônomo. Com relação à frequência de micção (fig.11A) foram observadas diferenças significativas com relação ao sexo, porém não foram detectadas alterações referentes às linhagens sem interação entre os fatores. As fêmeas mostraram menor frequência nesse parâmetro em relação aos machos. Não foram detectadas diferenças significativas entre os resultados da frequência de defecação (fig.11 B). Os dados da estatística são mostrados na tabela 1.

Figura 11 - Avaliação dos parâmetros do sistema nervoso autônomo dos camundongos *bate palmas* (n=15) e BALB/c (n=15). A- Frequência de micção; B- Frequência de defecação. São apresentadas as médias e respectivos erros-padrão. Anova de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. *** $P < 0.05$ em relação ao sexo.

Fonte: OLIVEIRA, 2017.

4.2 Labirinto em cruz elevado

A fig. 12 ilustra os resultados obtidos no teste do labirinto em cruz elevado observado em dois dias consecutivos. No primeiro dia de observação notou-se que no NEBA (fig.12 A) não houve diferenças significantes com relação ao sexo e linhagens mas verificou-se interação entre os fatores. O teste post hoc indicou que nas fêmeas do grupo *bate palmas* o NEBA foi

significativamente maior que daquelas do grupo controle. Não foram observadas diferenças significativas tanto entre os sexos e linhagens bem como na interação entre os fatores no NEBF (fig.12 C).

A respeito do TPBA (fig.12 E) notou-se interação entre os fatores, porém não se observou diferenças entre os sexos e linhagens. Verificou-se que nas fêmeas do grupo *bate palmas* o TPBA foi significativamente maior que daquelas do grupo controle. Com relação ao TPBF (fig.12 G) não foram encontradas alterações quanto ao sexo e linhagens e na interação entre os fatores. O comportamento de risco diferiu quanto ao sexo e linhagens sem interação entre os fatores (fig.12 I). Os camundongos *bate palmas* apresentaram menor comportamento de risco que seu respectivo grupo controle e as fêmeas do grupo *bate palmas* mostram aumento no parâmetro com relação ao respectivo grupo controle.

No segundo dia de observação notou-se que no NEBA (fig. 12 B) houve diferenças entre os sexos, porém sem interação entre os fatores. O teste post hoc mostrou que as fêmeas apresentaram maior NEBA que os machos. Não houve diferenças significativas entre as linhagens sem interação entre os fatores (fig.12 D).

A respeito do TPBA (fig.12 F) notou-se interação entre os fatores, porém não se observou diferenças entre os sexos e linhagens. Assim, verificou-se que nas fêmeas do grupo *bate palmas* o TPBA foi significativamente maior que daquelas do grupo controle. Com relação ao TPBF (fig.12H) não foram encontradas alterações quanto ao sexo e linhagens e na interação entre os fatores.

No comportamento de risco (fig.12 J) houve diferenças entre os sexos e linhagens com interação entre os fatores. O teste post hoc indicou que as fêmeas apresentaram maior comportamento de risco que machos e que as fêmeas *bate palmas* mostraram maior comportamento de risco que fêmeas do grupo controle. Os dados da estatística são mostrados na tabela 1.

Figura.12 - Avaliação dos parâmetros no labirinto em cruz elevado de camundongos bate palmas (n=15) e BALB/c (n=15). São apresentadas as médias e respectivos erros-padrão. Anova de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. ** $P < 0.05$ em relação ao grupo controle. As barras mostram diferenças significativa entre os sexos.

Labirinto em cruz elevada

4.3 Teste do labirinto em T

A figura 13 ilustra os resultados do teste do Labirinto em T. Não houve diferença significativa entre os grupos. Os dados da estatística são mostrados na tabela 1.

Figura 13 -: Comportamento de camundongos bate palmas (machos: n=13, fêmeas: n=14) e BALB/c (machos: n=13, fêmeas: n=14), no teste de alternância espontânea do labirinto em T. Os dados são apresentados como médias e respectivos erros padrão. Anova de duas vias.

Fonte: OLIVEIRA, 2017.

4.4. Coordenação motora em trave elevada

A figura 14 ilustra os resultados da trave elevada. Não se observou diferenças estatísticas em relação à linhagem sem interação entre os fatores. Houve diferenças estatísticas entre os sexos em que fêmeas mostraram menores escores que machos.

Figura.14 - Avaliação dos camundongos *bate palmas* (n=15) e BALB/c (n=15) no teste de coordenação motora observada em trave elevada. São apresentadas as médias e respectivos erros padrão. A barra representa diferença estatística entre sexos. ANOVA de duas vias seguida pelo teste pelo teste de Bonferroni. * $p < 0,05$.

Fonte: OLIVEIRA, 2017.

4.5 Teste de suspensão pela cauda

A figura 15 ilustra os resultados obtidos no teste de suspensão pela cauda dos camundongos mutantes machos e fêmeas e seus respectivos grupos controles. A respeito da latência para imobilidade (fig.15 A) observou-se diferenças entre os sexos sem alterações com relação a linhagem e interação entre os fatores. As fêmeas apresentaram menores latências para imobilidade que os machos. No tempo de imobilidade (fig.15 B) verificou-se diferenças significantes entre as linhagens e sexo sem interação entre os fatores. Nota-se que os machos *bate palmas* apresentaram maior tempo de imobilidade que os camundongos BALB/c. Ainda a respeito do sexo, as fêmeas apresentaram menor tempo de imobilidade que os machos. Os dados da estatística são mostrados na tabela 1.

Figura.15.- Avaliação dos parâmetros no teste de suspensão pela cauda de camundongos bate palmas (n=15) e BALB/c (n=15). São apresentadas as médias e respectivos erros-padrão. Anova de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. ** $P < 0.05$ em relação ao grupo controle. As barras mostram diferenças significativa entre os sexos.

Fonte: OLIVEIRA, 2017.

4.6. Teste nado forçado

A figura 16 mostra os resultados obtidos no teste do nado forçado. Pode-se notar que, na avaliação da latência para a primeira imobilidade (fig.16 A), não houve diferença estatística no fator linhagem, bem como a interação entre os fatores linhagem e sexo. Porém, existiu diferença estatística no fator sexo. Nota-se que as fêmeas apresentaram menor latência para imobilidade que os machos.

No tempo total de imobilidade (fig. 16 B), não houve diferença no fator sexo e na interação entre os fatores linhagem e sexo. No entanto, o fator linhagem apresentou diferença estatística em que os camundongos *bate palmas* apresentaram maior tempo de imobilidade que os camundongos BALB/c. Os dados da estatística são mostrados na tabela 1.

Figura 16 - Avaliação dos parâmetros no teste de natação forçada de camundongos bate palmas (n=15) e BALB/c (n=15). São apresentadas as médias e respectivos erros-padrão. Anova de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. ** $P < 0.05$ em relação ao grupo controle. As barras mostram diferenças significativa entre os sexos.

Fonte: OLIVEIRA, 2017.

Tabela 1 - Dados estatísticos do teste da ANOVA de duas vias referentes aos testes comportamentais empregados para a caracterização fenotípica do camundongo mutante bate palmas (n=15/sexo), comparado com seu controle BALB/c (n=15/sexo).SD- sem diferenças.

Parâmetro	Linhagem	Sexo	Interação
Sistema Sensorial			
Irritabilidade	SD	SD	SD
Reflexo auricular	$F_{1,56}=4,02, p=0,05$	$F_{1,56}=10,86, p=0,002$	$F_{1,56}=4,03, p=0,05$
Aperto de cauda	$F_{1,56}=1,60, p=0,18$	$F_{1,56}=12,39, p=0,0009$	$F_{1,56}=1,70, p=0,20$
Reflexo corneal	SD	SD	SD
Resposta ao toque	$F_{1,56}=1,40, p=0,24$	$F_{1,56}=1,0, p=0,32$	$F_{1,56}=0,02, p=0,89$
Sistema Psicomotor			
Contorção	SD	SD	SD
Queda do trem posterior	SD	SD	SD
Reflexo de endireitamento	$F_{1,56}=154,0, p < 0,0001$	$F_{1,56}=0,27, P=0,61.$	$F_{1,56}=0,27, P=0,60$
Tônus corporal	SD	SD	SD
Força de agarrar	SD	SD	SD
Sistema nervoso autônomo			
Micção	$F_{1,56}=0,11, p=0,74$	$F_{1,56}=15,51, p=0,0002$	$F_{1,56}=0,43, p=0,51$
Defecação	SD	SD	SD
Atividade geral			
Locomoção (s)	$F_{1,56}=0,02, P=0,89$	$F_{1,56}=2,42, p=0,12$	$F_{1,56}=1,42, p=0,51$
Levantar (frequência)	$F_{1,56}=5,85, p=0,02$	$F_{1,56}=3,54, p=0,06$	$F_{1,56}=0,35, p=0,56$
Limpeza (frequência)	$F_{1,56}=3,88, p=0,05$	$F_{1,56}=1,98, p=0,16$	$F_{1,56}=0,32, p=0,58$
Limpeza(s)	$F_{1,56}=0,48, p=0,49$	$F_{1,56}=1,37, p=0,25$	$F_{1,56}=0,30, p=0,59$
Labirinto em T			
Escore	$F_{1,50}=2,69, p=0,11$	$F_{1,50}=2,70, p=0,10$	$F_{1,50}=0,06, p=0,81$
Labirinto em cruz elevado			
NEBA-I	$F_{1,56}=4,79, p=0,03$	$F_{1,56}=0,28, p=0,60$	$F_{1,56}=1,28, p=0,27$
NBF-I	$F_{1,56}=0,85, p=0,36$	$F_{1,56}=1,24, p=0,26$	$F_{1,56}=0,28, p=0,60$
TPBA-I	$F_{1,56}=3,72, p=0,03$	$F_{1,56}=0,17, p=0,68$	$F_{1,56}=0,06, p=0,81$
TPBF-I	$F_{1,56}=0,07, p=0,79$	$F_{1,56}=0,18, p=0,67$	$F_{1,56}=3,04, p=0,08$
Comportamento de risco-I	$F_{1,56}=0,30, p=0,59$	$F_{1,56}=8,8, p=0,004$	$F_{1,56}=14,81, p=0,0003$
NEBA-II	$F_{1,56}=3,60, p=0,06$	$F_{1,56}=17,44, p=0,001$	$F_{1,56}=1,94, p=0,17$
NBF-II	$F_{1,56}=0,41, p=0,52$	$F_{1,56}=3,11, p=0,08$	$F_{1,56}=2,21, p=0,14$
TPBA-II	$F_{1,56}=2,51, p=0,12$	$F_{1,56}=8,21, p=0,006$	$F_{1,56}=2,21, p=0,11$
TPBF-II	$F_{1,56}=2,39, p=0,13$	$F_{1,56}=0,48, p=0,49$	$F_{1,56}=2,64, p=0,11$
Comportamento de risco-II	$F_{1,56}=6,17, p=0,02$	$F_{1,56}=8,84, p=0,004$	$F_{1,56}=7,0, p=0,01$
Natação forçada			
Latência para imobilidade	$F_{1,56}=0,29, p=0,59$	$F_{1,56}=8,19, p=0,006$	$F_{1,56}=0,65, p=0,42$

Tempo de imobilidade	$F_{1,56}=5,17, p = 0,03$	$F_{1,56}=1,51, p = 0,22$	$F_{1,56}=0,04, p = 0,85$
Parâmetro	Linhagem	Sexo	Interação
Suspensão da cauda			
Latência para imobilidade	$F_{1,56}=0,71, p = 0,40$	$F_{1,56}=38,37, p < 0,0001$	$F_{1,56}=1,10, p = 0,29$
Tempo de imobilidade	$F_{1,56}=11,80, p = 0,001$	$F_{1,56}=14,62, p = 0,0003$	$F_{1,56}=1,08, p = 0,30$
Trave elevada			
Escore	$F_{1,42}=0,08, p = 0,71$	$F_{1,42}=6,72, p = 0,01$	$F_{1,42}=0,06, p = 0,81$

SD- não foi possível submeter ao teste.

Fonte: OLIVEIRA, 2017.

5. DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A síndrome de Kabuki é caracterizada como uma anomalia congênita rara de caráter autossômico dominante e foi associada a uma mutação com perda de função de um alelo do gene KMT2D, também conhecido como MLL2 ou MLL4, localizado no cromossomo 12 em humanos e no cromossomo 15 em camundongos (NG et al., 2010; MICALE et al., 2011; (MAKRYTHANASIS et al., 2013; MICALE et al., 2011; VALLIANATOS; IWASE; ARBOR, 2016).

Os primeiros experimentos deste trabalho visaram caracterizar os aspectos motores, sensoriais e do sistema nervoso nos camundongos mutantes *bate palmas* comparados com seu grupo controle BALB/c. Inicialmente esta análise revelou redução sensorial nos camundongos *bate palmas* no que se refere ao reflexo auricular e na resposta de aperto de cauda.

O reflexo auricular está ligado fundamentalmente às vias dos neurônios cocleares, o qual é um modelo frequentemente empregado como modelo de integração sensorial (HORTA et al., 2008). Estimulações acústicas intensas levam a este reflexo e, lesões ou traumas nesta via, refletem-se em redução na resposta ao estímulo (RYBALKO et al., 2011), sugerindo redução na audição. Portanto, pode-se aventar que o camundongo *bate palmas* possa ter alguma deficiência auditiva. Neste sentido, o distúrbio auditivo é uma alteração comum e relatada por diversos autores na síndrome de Kabuki (BRITO; MISQUIATTI, 2009). No entanto, para confirmar essa hipótese será necessário realizar testes mais específicos visando avaliar a capacidade auditiva do camundongo mutante.

Observou-se também redução na resposta de aperto de cauda, evidenciando que os camundongos mutantes, em particular as fêmeas, apresentaram menor sensibilidade dolorosa por pressão. Até o momento, não existem trabalhos que mostram alguma correlação de redução na sensibilidade dolorosa em pacientes com a síndrome de Kabuki.

Quanto ao aspecto psicomotor, verificou-se redução no reflexo de endireitamento em ambos os sexos e maior queda do trem posterior em machos nos mutantes *bate palmas*. Possivelmente esse resultado pressupõe a

existência de deficiências motoras nestes animais, tal como hipotonia. Neste sentido, em alguns pacientes com Síndrome de Kabuki foi observada hipotonia (RITTINGER, 2001; BANKA et al., 2015).

Por outro lado, os parâmetros ligados ao sistema nervoso autônomo não se apresentaram alterados nos *bate palmas* comparados aos seus controles.

Com relação ao sexo, notou-se que apenas na queda do trem posterior, as fêmeas diferiram dos machos *bate palmas*.

Para avaliar a coordenação motora, os mutantes *bate palmas* foram observados na trave elevada. Não houve diferenças entre os camundongos do grupo controle e mutantes. O que se notou foi que em relação ao sexo, as fêmeas de ambas as linhagens mostraram redução no parâmetro.

A atividade geral em campo aberto é um modelo que investiga a exploração e a emocionalidade de um animal exposto a um ambiente novo (ORTET; IBANEZ, 1999). Presentemente verifica-se que os camundongos *bate palmas* mostram aumento na frequência de levantar em ambos sexos. Apenas nos machos, a frequência de limpeza foi maior que o respectivo controle, mas não foram observadas nas duas linhagens diferenças significativas na frequência de locomoção. Esses resultados corroboram com os dados da literatura em que os camundongos geneticamente modificados $kmt2d^{+/βGeo}$, considerados como modelo para estudo da síndrome de Kabuki, apresentaram atividade geral em campo aberto similar aos seus controles (BJORNSSON et al., 2014).

A frequência de locomoção é um parâmetro relacionado com a ativação de áreas ligadas ao sistema mesolímbico dopaminérgico (JESTE; SMITH, 1980)(BERNARDI; PALERMO-NETO, 1983). Por outro lado, o levantar observado no campo aberto está sob o controle do sistema dopaminérgico Nigro-estriatal (BERNARDI,MM; PALERMO-NETO et al., 1984;CHARTOFF et al., 2001). Drogas agonistas de receptores dopaminérgicos promovem comportamento estereotipado por ativar o sistema Nigro-estriatal (BERNARDI,MM; PALERMO-NETO et al., 1984;CHARTOFF et al., 2001). Portanto, é possível que o aumento do levantar no teste do campo aberto possa representar uma maior ativação do sistema Nigro-estriatal e resultar em estereotipia. Neste sentido, estudos em andamento de nosso grupo mostraram que a administração de apomorfina para os camundongos *bate palmas*

aumentaram o comportamento estereotipado, o qual foi revertido pela administração de um antagonista de receptores dopaminérgicos D1 (Bernardi, MM- comunicação pessoal). Também o aumento da limpeza observado nos machos *bate palmas* pode representar um comportamento estereotipado dependente do sistema dopaminérgico (BERRIDGE; ALDRIDGE, 2000). Interessante foi que somente os machos *bate palmas* apresentaram essa estereotipia sugerindo um comportamento sexualmente dimórfico nos mutantes.

Atualmente são poucos os modelos animais descritos na literatura para estudo da síndrome de Kabuki. Uma publicação recente descreve o modelo murino heterozigoto $kmt2d^{+/βGeo}$, também conhecido como $Mll2^{Gt(RRt024)Byg}$ que apresenta déficit de memória relacionada ao hipocampo. Em relação ao comportamento, esses camundongos demonstraram desempenho inferior aos controles nos testes de reconhecimento de objetos e labirinto aquático de Morris. No entanto, não houve redução da atividade geral em campo aberto, na força de agarrar e velocidade de natação, sugerindo deficiência de memória relacionada ao hipocampo (BJORNSSON et al., 2014). Enquanto nos camundongos homozigotos $kmt2d^{βGeo/βGeo}$, observa-se letalidade precoce dos embriões com 12 dias de desenvolvimento, os *bate palmas* possuem a mutação em homozigose e apresentam um ciclo de vida normal.

Segundo os mesmos autores, os mutantes $kmt2d^{+/βGeo}$ apresentaram também características craniofaciais consistentes com alterações observadas na síndrome de Kabuki em humanos, incluindo focinho achatado, rotação do canal auditivo para baixo e maxila menor em relação ao controle.

Da mesma forma, outros modelos em camundongos com perda de função de um alelo para o gene *kmt2a* (*mll1*) e *kmt2b* (*mll2*) também demonstraram deficiência na aprendizagem e memória relacionada ao hipocampo, alterações na plasticidade sináptica e defeitos na neurogênese, sugerindo que *mll1* e *mll2* possuem funções redundantes no hipocampo (KERIMOGLU et al., 2013); Shen et al. 2014; Jakovcevski et al. 2015). Os animais homozigotos também morrem precocemente por volta do décimo dia de desenvolvimento embrionário, já os mutantes *bate palmas* apresentaram ciclo de vida normal, notando-se apenas menor capacidade reprodutiva quando comparados aos camundongos BALB/c.

Presentemente foram avaliados dois modelos de aprendizagem: a memória em labirinto em cruz elevada e a alternância no labirinto em T.

O labirinto em cruz elevada foi desenvolvido para avaliação de medicamentos ansiolíticos e baseia-se na aversão que os roedores tem a espaços abertos pois nessa situação, eles podem ser predados (RODGERS et al., 1997). Nesse trabalho, os camundongos foram expostos a dois dias consecutivos ao aparelho. No primeiro dia, o que se avalia é a resposta denominada aversiva aos espaços abertos considerada como ansiogênica e no segundo dia a memória da situação aversiva.

Verificou-se que os camundongos *bate palmas* permaneceram mais tempo no braço aberto, que indicaria redução na ansiedade. No caso, as fêmeas ficaram mais tempo nesse local e os machos mostraram tendência similar, comparados aos seus respectivos grupos controle. Portanto, os camundongos *bate palmas*, por este teste, seriam menos ansiosos que os camundongos BALB/c. Reforça essa proposição o fato de que os camundongos *bate palmas* dos dois sexos apresentaram menor comportamento de risco que evidencia menor comportamento defensivo, típico de roedores com redução da ansiedade (HUBBARD et al., 2004).

No segundo dia de teste avaliou-se a evocação da memória aversiva espacial dos animais à exposição no dia anterior. Os resultados mostraram que não houve perda de memória nos camundongos machos *bate palmas* uma vez que seu comportamento não diferiu daqueles de seu respectivo grupo controle. A respeito das fêmeas, nota-se que as fêmeas *bate palmas* tiveram maior comportamento de risco que aquelas do grupo controle. Além disso, verificou-se dimorfismo sexual em que as fêmeas permaneceram e entraram mais nos braços abertos. É possível que o maior comportamento de risco das fêmeas seja resultado de sua maior exploração dos braços do labirinto em cruz elevada. Assim, sugere-se que as fêmeas *bate palmas* possam ter tido uma perda de memória com relação aos seu grupo controle neste teste.

O teste do labirinto em T avalia a memória operacional que está sob o controle de várias áreas corticais, principalmente o hipocampo (DEACON; RAWLINS, 2006). Neste teste a tendência do camundongo é explorar sempre o lado oposto do braço do labirinto àquele anteriormente escolhido (DEACON; RAWLINS, 2006). Os camundongos *bate palmas* não apresentaram

comportamento diferente dos camundongos BALB/c, sugerindo então que a mutação não prejudicou este tipo de aprendizagem. Desta forma, o camundongo *bate palmas* difere dos mutantes $kmt2d^{+/βGeo}$ no que se refere aos modelos de aprendizagem ligados ao hipocampo.

O teste de suspensão pela cauda foi desenvolvido para avaliação de medicamentos antidepressivos em que o antidepressivo reduz o tempo de imobilidade dos animais (STERU et al., 1985). Da mesma forma, o teste de natação forçada, também reflete efeitos de antidepressivos por reduzir o tempo de flutuação dos animais (SLATTERY; CRYAN, 2012).

Os resultados mostram que nos dois modelos os camundongos mostraram um perfil similar em que os camundongos *bate palmas* teriam maior imobilidade que seus pares BALB/c. Assim, os machos *bate palmas* apresentaram maior imobilidade nos dois testes enquanto que as fêmeas somente no teste de natação forçada. Estas diferenças já foram observadas por diversos autores e indicam a existência de dimorfismo sexual nestes modelos (PALANZA, 2001)(DALLA et al., 2010).

Como dito, ambos os testes, suspensão pela cauda e natação forçada são empregados para avaliação de medicamentos antidepressivos não sendo um modelo de depressão. A interpretação dos presentes dados deverá então se ater a outros aspectos dos modelos estudados.

Tanto a natação forçada como o teste de suspensão da cauda promovem altos níveis de estresse uma vez que são situações em que o animal não pode escapar. Recentemente, em nosso laboratório, observamos que na colônia de camundongos Swiss do biotério do Departamento de Patologia da FMVZ/USP pôde-se selecionar três tipos de fenótipos quando submetidos ao teste de suspensão da cauda: um fenótipo com alta imobilidade, outro com baixa imobilidade e um intermediário. Os animais de alta imobilidade quando testados em modelos de depressão não mostraram perfil de animais tipo-depressivos como seria esperado quando comparados aos animais com baixa imobilidade. A exposição ao estresse revelou de forma clara estas diferenças. Diante desses resultados, propôs-se que os animais de baixa

imobilidade seriam resilientes ao estresse e os de alta imobilidade não resilientes (comunicação pessoal)².

Evidentemente um exame mais detalhado dos resultados presentemente apresentados poderão elucidar se os camundongos *bate palmas* apresentaram comportamento tipo-depressivo ou se suas respostas nos testes de suspensão da cauda e de natação forçada foram de outra natureza.

² Informação fornecida pela Doutora Martha Bernardi, em maio de 2017

6. CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Os dados do presente estudo permitiram concluir que:

Não houve alteração na atividade geral do camundongo mutante *bate palmas* comparado ao controle BALB/c.

O mutante *bate palmas* apresentou aumento na frequência de levantar em ambos os sexos, sugerindo comportamento estereotipado.

Na avaliação do sistema sensorial houve redução no reflexo auricular do mutante *bate palmas*, sugerindo uma possível deficiência auditiva. Também houve redução na resposta de aperto de cauda nas fêmeas mutantes *bate palmas*, revelando menor sensibilidade dolorosa.

Em relação aos parâmetros psicomotores houve diminuição do reflexo de endireitamento e queda do trem posterior, sugerindo deficiência motora, como a hipotonia.

Os resultados do teste de labirinto em cruz elevada identificaram menor nível de ansiedade nos mutantes em comparação aos controles. Ainda, as respostas observadas no segundo dia do teste, referente à evocação da memória aversiva espacial, mostraram que não houve perda de memória dos *bate palmas*.

O teste do labirinto em T também mostrou que não houve alteração na memória espacial dos camundongos mutantes em relação aos BALB/c.

Os resultados dos testes de suspensão pela cauda e de natação forçada foram semelhantes, indicando maior tempo de imobilidade dos mutantes em comparação aos BALB/c.

Analisados em conjunto, os resultados desse estudo sugerem que o mutante *bate palmas* apresentou alterações nos parâmetros sensoriais e psicomotores e possível comportamento estereotipado, relacionadas à mutação do gene *kmt2d*.

7. REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ADAMS, D. J.; DORAN, A. G.; LILUE, J.; KEANE, T. M. The Mouse Genomes Project: a repository of inbred laboratory mouse strain genomes. **Mammalian Genome**, New York, v. 26, n. 9-10, p. 12 - 403. 2015.
- BANKA, S. LEDERER D.; BENOIT, V.; JENKINS, E.; HOWARD, E.; BUNSTONE, S.; KERR, B.; McKEE, S.; LLOYD, I. C.; STEWART, H.; WHITE, S. M.; SAVARIRAYAN, R.; MANCINI, G. M.; BEYSEN, D.; COHN, R. D.; GRISART, B.; MAYSTADT, I.; DONNAI, D. Novel KDM6A (UTX) mutations and a clinical and molecular review of the X-linked Kabuki syndrome (KS2). **Clinical Genetics**, New Delhi, v. 87, n. 3, p. 252–258, 2015.
- BENJAMIN, J. S.; PILAROWSKI, G. O.; CAROSSO, G. A.; ZHANG, L.; HUSO, D. L.; GOFF, L. A.; VERNON, H. J.; HANSEN, K. D.; BJORNSSON, H. T. A ketogenic diet rescues hippocampal memory defects in a mouse model of Kabuki syndrome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, New Delhi, v. 114, n. 1, p. 125–130, 2017.
- BERNARDI, M. M.; PALERMO NETO, J. Effects of apomorphine administration on rearing activity of control and experimental rats withdrawn from long-term haloperidol treatment. **General pharmacology**, Oxford, v. 15, n. 4, p. 363–365, 1984.
- BERNARDI, M. M.; PALERMO-NETO, J. Effects of apomorphine administration on locomotor activity of control and experimental rats withdrawn from long-term haloperidol treatment. **General Pharmacology**, Oxford, v. 14, n. 5, p. 545–547, 1983.
- BERRIDGE, K. C.; ALDRIDGE, J. W. Super-stereotypy I: enhancement of a complex movement sequence by systemic dopamine D1 agonists. **Synapse**, New York , v. 37, n. 3, p. 194–204, 2000.
- BJORNSSON, H. T.; BENJAMIN, J. S.; ZHANG, L.; WEISSMAN J.; GERBER, E. E.; CHEN, Y. C.; VAURIO, R. G.; POTTER, M. C.; HANSEN, K. D.; DIETZ, H. C. Histone deacetylase inhibition rescues structural and functional brain deficits in a mouse model of Kabuki syndrome. **Science Translational Medicine**, Cambridge , v. 6, n. 256, p. 256ra135-256ra135, 2014.
- BÖGERSHAUSEN, N.; GATINOIS, V.; RIEHMER, V.; KAYSERILI, H.; BECKER, J.; THOENES, M.; TINSCHERT, S. Mutation Update for Kabuki Syndrome Genes KMT2D and KDM6A and Further Delineation of X-Linked Kabuki Syndrome Subtype 2. **Human Mutation**, New York , v. 37, n. 9, p. 847–864, 2016.
- BRITO, M. C.; MISQUIATTI, A. R. N. RELATO DE CASO Language intervention in the Kabuki syndrome: case report. **Revista.CEFAC**, São Paulo, v. 12, n. 4, p. 693 - 699. 2009.

BULT, C. J.; EPPIG, J. T.; BLAKE, J. A.; KADIN, J. A.; RICHARDSON, J. E. The mouse genome database: genotypes, phenotypes, and models of human disease. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 41, n. D1, p. 885–891, 2013.

CHARTOFF, E. H.; MARCK B. T.; MATSUMOTO, A. M.; DORSA, D. M.; PALMITER, R. D. Induction of stereotypy in dopamine-deficient mice requires striatal D1 receptor activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington , v. 98, n. 18, p. 10451–6, 2001.

CoNeCte – Blog da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento. Stéfano Pupe. **Softwares gratuitos para análise do Labirinto em Cruz Elevado e Campo Aberto**. Disponível em: <<http://blog.sbnec.org.br/2010/07/softwares-gratuitos-para-analise-do-labirinto-emcruz-elevado-e-campo-aberto/>>. Acesso em: 03 jun. 2017.

DALLA, C.; PITYCHOUTIS, P. M.; KOKRAS, N.; PAPADOPOULOU-DAIFOTI, Z. Sex differences in animal models of depression and antidepressant response. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, Copenhagen, v. 106, n. 3, p. 226–33, mar. 2010.

DEACON, R. M. J.; RAWLINS, J. N. P. T-maze alternation in the rodent. **Nature protocols**, London , v. 1, n. 1, p. 7–12, 2006.

GUENET, J. L. The mouse genome. **Genome Research**. Cold Spring Harbor, v.15, n.12, p. 1729 - 1740. 2005.

HORTA JÚNIOR, J. A.; LÓPEZ, D. E.; ALVAREZ-MORUJO, A. J.; BITTENCOURT, J. C. Direct and indirect connections between cochlear root neurons and facial motor neurons: pathways underlying the acoustic pinna reflex in the albino rat. **Journal of Comparative Neurology**, Philadelphia , v. 507, n. 5, p. 1763–1779, 2008.

HUBBARD, D. T.; BLANCHARD, D. C.; YANG, M. MARKHAM, C. M.; GERVACIO, A.; CHUN-L. L.; BLANCHARD, R. J. Development of defensive behavior and conditioning to cat odor in the rat. **Physiology and Behavior**, Oxford, v. 80, n. 4, p. 525–530, 2004.

IMSR- International Mouse Strain Resource. Disponível em: <<http://www.findmice.org/>>. Acesso em: 07 jun. 2017.

JAKOVCEVSKI, M.; RUAN, H.; SHEN, E. Y.; DINCER, A.; JAVIDFAR, B.; MA, Q.; PETER, C. J.; CHEUNG, I.; MITCHELL, A. C.; JIANG, Y.; LIN, C.; L.; POTHULA, V.; STEWART, A. F.; ERNST, P.; YAO, W. D.; AKBARIAN, S. Neuronal Kmt2a/Mll1 histone methyltransferase is essential for prefrontal synaptic plasticity and working memory. **Journal of Neuroscience**, New York, v. 35, n. 13, p. 5097–5108, 2015.

JESTE, D. V.; SMITH, G. P. Unilateral mesolimbocortical dopamine denervation decreases locomotion in the open field and after amphetamine. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, New York, v. 12, n. 3, p. 453–457, 1980.

JUSTICE, M. J.; NOVEROSKE, J. K.; WEBER, J. S.; ZHENG, B.; BRADLEY, A. Mouse ENU mutagenesis. *Human Molecular Genetics*, Oxford, v. 8, n. 10, p. 1955–1963, 1999.

JUSTICE, M. J. Capitalizing on large-scale mouse mutagenesis screens. *Nature reviews. Genetics*, Oxford, v. 1, n. 2, p. 109–15, 2000.

KERIMOGLU, C.; AGIS - BALBOA, R. C.; KRANZ, A.; STILLING, R.; BAHARI-JAVAN, S.; BENITO-GARAGORRI, E.; FISCHER I. Histone-Methyltransferase MLL2 (KMT2B) Is required for memory formation in mice. *Journal of Neuroscience*, New York, v. 33, n. 8, p. 3452–3464, 2013.

KIRSTEN, T. B.; CHAVES-KIRSTEN, G. P.; BERNADES, S.; SCAVONE, C.; SARKIS, J. E.; BERNADI, M. M.; FELICIO, L. F. Lipopolysaccharide exposure induces maternal hypozincemia, and prenatal zinc treatment prevents autistic-like behaviors and disturbances in the striatal dopaminergic and mtor systems of offspring. *PLoS ONE*, San Francisco, v. 10, n. 7, 2015.

KUMAR, A.; JAGGI, A. S.; SINGH, N. Pharmacological investigations on possible role of src kinases in neuroprotective mechanism of ischemic postconditioning in mice. *International Journal of Neuroscience*, New York, v. 124, n. 10, p. 777–786, 2014.

KUROKI, Y.; SUZUKI, Y.; CHYO, H.; HATA, A.; MATSUI, I. A new malformation syndrome of long palpebral fissures, large ears, depressed nasal tip, and skeletal anomalies associated with postnatal dwarfism and mental retardation. *The Journal of Pediatrics*, New York, 1981.

KUROKI, Y.; KATSUMATA, N.; EGUCHI, T.; FUKUSHIMA, Y.; SUWA, S.; KAJII, T.. Precocious puberty in Kabuki make up syndrome, *The Journal of Pediatrics*, New York, v. 110, n. 5, p. 750- 752. 1987.

LAUREANO-MELO, R.; SILVEIRA, A. L.; AZEVEDO, F. C. S.; CONCEIÇÃO, R. R.; SILVA ALMEIDA, C.; MARINHO, B. G. ROCHA, F. F.; REIS, L. C.; CÔRTEZ, W. S. Behavioral profile assessment in offspring of Swiss mice treated during pregnancy and lactation with caffeine. *Metabolic Brain Disease*, New York, v. 31, n. 5, p. 1071–1080, 2016.

LISTER, R. G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacology & therapeutics*, Oxford, v. 46, n. 3, p. 321–340, 1990.

MAKRYTHANASIS, P.; VAN BON, B. W.; STEEHOUWER, M.; RODRÍGUEZ-SANTIAGO, B.; SIMPSON, M.; DIAS, P.; ANDERLID, B. M.; ARTS, P.; BHAT, M.; AUGELLO, B.; BIAMINO E.; BONGERS, E. M.; DEL CAMPO, M.; CORDEIRO, I.; CUETO-GONZÁLEZ, A. M.; CUSCÓ, I.; DESHPANDE, C.;

FRYSIRA, E.; IZATT, L.; FLORES, R.; GALÁN, E.; GENER, B.; GILISSEN, C.; GRANNEMAN, S. M.; HOYER, J.; YNTEMA, H. G.; KETS, C. M.; KOOLEN D. A.; MARCELIS, C. L.; MEDEIRA, A.; MICALÉ, L.; MOHAMMED, S.; DE MUNNIK, S. A.; NORDGREN, A.; PSONI, S.; REARDON, W.; REVENCU, N.; ROSCIOLI, T.; RUITERKAMP-VERSTEEG, M.; SANTOS, H. G.; SCHOUMANS, J.; SCHUURS-HOEIJMAKERS, J. H.; SILENGO, M. C.; TOLEDO, L.; VENDRELL, T.; VAN DER BURGT, I.; VAN LIER B.; ZWEIER, C.; REYMOND, A.; TREMBATH, R. C.; PEREZ-JURADO, L.; DUPONT, J.; DE VRIES, B. B.; BRUNNER, H. G.; VELTMAN, J. A.; MERLA, G.; ANTONARAKIS, S. E.; HOISCHEN, A. MLL2 mutation detection in 86 patients with Kabuki syndrome: a genotype-phenotype study. **Clinical Genetics**, v. 84, n. 6, p. 539–545, 2013.

MASSIRONI, S. M.; REIS, B. L.; CARNEIRO, J. G.; BARBOSA, L. B.; ARIZA, C. B.; SANTOS, G. C.; GUÉNET, J. L.; GODARD, A. L. Inducing mutations in the mouse genome with the chemical mutagen ethylnitrosourea. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 39, n. 9, p. 1217–1226, 2006.

MICALÉ, L.; AUGELLO, B.; FUSCO, C.; SELICORNI, A.; LOVIGLIO, M. N.; SILENGO, M. C.; REYMOND, A.; GUMIERO, B.; ZUCCHETTI, F.; D'ADDETTA, E.V.; BELLIGNI, E.; CALCAGNI, A.; DIGILIO, M.C.; DALLAPICCOLA, B.; FARAVELLI, F.; FORZANO, F.; ACCADIA, M.; BONFANTE, A.; CLEMENTI, M.; DAOLIO, C.; DOUZGOU, S.; FERRARI, P.; FISCHETTO, R.; GARAVELLI, L.; LAPI, E.; MATTINA, T.; MELIS, D.; PATRICELLI, M. G.; PRIOLO, M.; PRONTERA, P.; RENIERI, A.; MENCARELLI, M. A.; SCARANO, G.; DELLA MONICA, M.; TOSCHI, B.; TUROLLA, L.; VANCINI, A.; ZATTERALE, A.; GABRIELLI, O.; ZELANTE, L.; MERLA, G. Mutation spectrum of MLL2 in a cohort of kabuki syndrome patients. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, London, v. 6, n. 1, p. 38, 2011.

MIYAKE, N.; KOSHIMIZU, E.; OKAMOTO, N.; MIZUNO, S.; OGATA, T.; NAGAI, T.; KOSHO, T.; OHASHI, H.; KATO, M.; SASAKI, G.; MABE, H.; WATANABE, Y.; YOSHINO, M.; MATSUISHI, T.; TAKANASHI, J.; SHOTELERSUK, V.; TEKIN, M.; OCHI, N.; KUBOTA, M.; ITO, N.; IHARA, K.; HARA, T.; TONOKI, H.; OHTA, T.; SAITO, K.; MATSUO, M.; URANO, M.; ENOKIZONO, T.; SATO, A.; TANAKA, H.; OGAWA, A.; FUJITA, T.; HIRAKI, Y.; KITANAKA, S.; MATSUBARA, Y.; MAKITA, T.; TAGURI, M.; NAKASHIMA, M.; TSURUSAKI, Y.; SAITSU, H.; YOSHIURA, K.; MATSUMOTO, N.; NIIKAWA, N. MLL2 and KDM6A mutations in patients with Kabuki syndrome. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, New York, v. 161, n. 9, p. 2234–2243, 2013.

NG, S.B.; BIGHAM, A W.; BUCKINGHAM, K. J.; HANNIBAL, M. C.; MCMILLIN, M. J.; GILDERSLEEVE, H. I.; BECK, A.E.; TABOR, H. K.; COOPER, G. M.; MEFFORD, H. C.; LEE, C.; TURNER, E.H.; SMITH, J. D.; RIEDER, M. J.; YOSHIURA, K.; MATSUMOTO, N.; OHTA, T.; NIIKAWA, N.; NICKERSON, D. A.; BAMSHAD, M. J.; SHENDURE, J. Exome sequencing identifies MLL2 mutations as a cause of Kabuki syndrome. **Nature genetics**, London, 2010.

NIKAWA, N.; MATSUURA, N.; FUKUSHIMA, Y. OHSAWA, T. KAJII, T. Kabuki make-up syndrome: A syndrome of mental retardation, unusual facies, large and protruding ears, and postnatal growth deficiency. **The Journal of Pediatrics**, 1981.

NIKAWA, N.; KUROKI, Y.; KAJII, T.; MATSUURA, N.; ISHIKIRIYAMA, S.; TONOKI, H. ISHIKAWA, N.; YAMADA, Y.; FUJITA, M.; UMEMOTO, H. Kabuki make-up (Niikawa-Kuroki) syndrome: a study of 62 patients. **American Journal Of Medical Genetics**, New York, 1988.

ORTET, G.; IBANEZ, M. I. Open- Field exploration and emotional reactivity in mice. **Psicothema**, Oviedo, v. 11, n. 1, p. 75–81, 1999.

PALANZA, P. Animal models of anxiety and depression: how are females different? **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, New York, v. 25, n. 3, p. 219–233, 2001.

RITTINGER, O. Niikawa-Kuroki (Kabuki) syndrome in a 13 year old Austrian boy. **Monatsschrift Kinderheilkunde**, Berlin, v. 149, n. 6, p. 579–581, 2001.

RODGERS, R. J.; CAO, B. J.; DALVI, A.; HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 30, p. 289–304, 1997.

RUSSELL, L. B.; HUNSICKER, P. R.; CACHEIRO, N. L.; BANGHAM, J. W.; RUSSELL, W. L.; SHELBY, M. D. Chlorambucil effectively induces deletion mutations in mouse germ cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 86, n. 10, p. 3704–8, 1989.

RYBALKO, N.; BUREŠ, Z.; BURIANOVÁ, J.; POPELÁŘ, J.; GRÉCOVÁ, J.; SYKA, J. Noise exposure during early development influences the acoustic startle reflex in adult rats. **Physiology & behavior**, Oxford, v. 102, n. 5, p. 453–8, 2011.

SANTOS ALINE SILVA, SANTOS NETO FERNANDO PRESÍDIO, R. T. A.; SILVA DELSON ARCANJO, SOUZA DELANO OLIVEIRA, GUIMARÃES ISABEL CRISTINA BRITTO, G. A. Características orais e craniofaciais da Síndrome de Kabuki: relato de um caso. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 12, n. 3, p. 385–388, 2013.

SHEN, E.; SHULHA, H.; WENG, Z.; AKBARIAN, S. I. Regulation of histone H3K4 methylation in brain development and disease. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, London, v. 369, n. 1652, p. 20130514, 2014.

SHIBUYA, T.; MORIMOTO, K. A review of the genotoxicity of 1-ethyl-1-nitrosourea. **Mutation Research - Reviews in Genetic Toxicology**, Amsterdam , v. 297, n. 1, p. 3–38, 1993.

SLATTERY, D. A; CRYAN, J. F. Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. **Nature Protocols**, London, v. 7, n. 6, p. 1009–1014, 2012.

STERU, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; SIMON, P. The tail suspension test: A new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, Berlin, v. 85, p. 367–370, 1985.

VALLIANATOS, C. N.; IWASE, S.; ARBOR, A. **HHS Public Acces**, Atlanta, . v. 7, n. 3, p. 503–519, 2016.

VAN LAARHOVEN, P. M.; NEITZEL, L. R.; QUINTANA, A; M.; GEIGER, E. A.; ZACKAI, E. H.; CLOUTHIER, D. E. ARTINGER, K. B.; MING, J. E. SHAIKH, T. H. Kabuki syndrome genes KMT2D and KDM6A: functional analyses demonstrate critical roles in craniofacial, heart and brain development. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 24, n. 15, p. 4443–4453, 2015.

WESSELS, M. W.; BROOKS, A. S.;HOOGEBOOM, J. NIERMEIJER, M. F.; WILLEMS, P. J. Kabuki syndrome: a review study of three hundred patients. **Clin Dysmorphol**, London, v.11, n.2, p. 95- 102. 2002.

YOSHIZAKI, K.; FURUSE, T.; KIMURA, R.; TUCCI, V.; KANEDA, H.; WAKANA, S.; OSUMI, N. Paternal aging affects behavior in Pax6 mutant mice: A gene/environment interaction in understanding neurodevelopmental disorders. **Public Library of Science one**, v. 11, n. 11, p. e0166665. 2016.