MARIANNA MANES

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E ANÁLISE DO SISTEMA
NERVOSO CENTRAL DOS CAMUNDONGOS MUTANTES
EQUILÍBRIO E *MERGULHADOR* INDUZIDOS PELO AGENTE
MUTAGÊNICO N-ETHYL-N-NITROSOUREA

São Paulo
2017

MARIANNA MANES

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E ANÁLISE DO SISTEMA NERVOSO
CENTRAL DOS CAMUNDONGOS MUTANTES *EQUILÍBRIO* E
MERGULHADOR INDUZIDOS PELO AGENTE MUTAGÊNICO N-ETHYL-N-
NITROSOUREA

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

Departamento:

Patologia

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientadora:

Prof.^a Dr.^a Claudia Madalena Cabrera Mori

De acordo: Claudia m c mori

(Prof.^a Dr.^a 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. 3575
FMVZ

Manes, Marianna
Caracterização fenotípica e análise do sistema nervoso central dos camundongos
mutantes equilíbrio e mergulhador induzidos pelo agente mutagênico n-ethyl-n-
nitrosourea / Marianna Manes. -- 2017.
100 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. Modelo animal. 2. Disfunção vestibular. 3. Comportamento. 4. Nox3. 5. Otop1. I.
Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E ANÁLISE DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DOS CAMUNDONGOS MUTANTES EQUILÍBRIO E MERGULHADOR INDUZIDOS PELO AGENTE MUTAGÊNICO N-ETHYL-N-NITROSOUREA", protocolada sob o CEUA nº 3930220116, sob a responsabilidade de **Cláudia Madalena Cabrera Mori e equipe; Marianna Manes; Maria Martha Bernardi; Silvia 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 - está 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, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 06/10/2016.

We certify that the proposal "PHENOTYPIC CHARACTERIZATION AND CENTRAL NERVOUS SYSTEM ANALYSIS OF MUTANT MICE EQUILÍBRIO AND MERGULHADOR INDUCED WITH THE CHEMICAL MUTAGEN ETHYLNITROSOUREA", utilizing 60 Isogenics mice (60 males), protocol number CEUA 3930220116, under the responsibility of **Cláudia Madalena Cabrera Mori and team; Marianna Manes; Maria Martha Bernardi; Silvia 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 - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as 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 (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 10/06/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **02/2016** a **02/2018**

Área: **Patologia Experimental E Comparada**

Origem:	Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Imunologia do ICB/USP			
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Machos	idade: 8 a 20 semanas N: 20
Linhagem:	BALB/c	Peso:	20 a 30 g	
Origem:	Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Imunologia do ICB/USP			
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Machos	idade: 8 a 20 semanas N: 20
Linhagem:	Equilíbrio	Peso:	20 a 30 g	
Origem:	Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Imunologia do ICB/USP			
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Machos	idade: 8 a 20 semanas N: 20
Linhagem:	Mergulhador	Peso:	20 a 30 g	

Resumo: O camundongo de laboratório é amplamente utilizado como modelo animal na investigação de componentes genéticos e celulares que são relevantes para o entendimento de processos fisiológicos e patológicos em humanos e outras espécies animais. Relatos de literatura descrevem inúmeras mutações em diferentes regiões do genoma do camundongo causando importantes desordens neurológicas. O presente projeto tem como objetivo caracterizar o fenótipo dos camundongos mutantes equilíbrio e mergulhador por meio da avaliação dos resultados de testes comportamentais, análises anatomopatológicas e histopatológicas e quantificação de neurotransmissores. O camundongo mutante recessivo mergulhador (mlh) apresenta disfunção vestibular caracterizada fenotipicamente pela incapacidade de nadar, posição inclinada da cabeça (head tilt), movimentos de chacoalhar quando suspensos pela cauda e defeitos na morfogênese das otocônias. O mapeamento genético identificou a mutação no gene *Otopetrin 1* (*Otop1mlh*), localizado no cromossomo 5. O camundongo mutante recessivo denominado equilíbrio (eqlb), apresenta deficiência de equilíbrio e incoordenação motora. Na análise histopatológica evidenciou-se formação anormal das camadas celulares do cerebelo, com desorganização da camada de células de Purkinje e espessamento da camada granular externa. O mapeamento genético identificou a mutação no gene *NADPH oxidase 3* (*Nox3*), cromossomo 17, descrito na literatura como responsável por defeitos vestibulares e na formação das otocônias. A caracterização fenotípica desses camundongos mutantes será realizada pela avaliação de parâmetros comportamentais de motilidade, psicomotores, sensoriais e ligados ao sistema nervoso por meio de observação direta dos animais. Serão utilizados camundongos machos com 8 semanas de idade, sendo cada um dos grupos experimentais compostos por 20 animais conforme segue: equilíbrio, mergulhador e BALB/c (controle). Inicialmente, os testes serão realizados no campo aberto e ordenados por parâmetro avaliado, na seguinte sequência: 1) atividade geral dos animais 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 dos sistemas nervoso central e autônomo: tremores, convulsões, cauda em pé, sedação, anestesia, ataxia, ptose, lacrimação, micção e

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Comissão de Ética no Uso de Animais

defecação. Os demais testes realizados serão: o reconhecimento de objetos, labirinto em cruz elevado, labirinto em T, trave elevada, suspensão pela cauda e nado forçado.

Local do experimento: Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ/USP Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Imunologia ICB/USP

São Paulo, 10 de outubro de 2016

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: MANES, Marianna

Título: Caracterização fenotípica e análise do sistema nervoso central dos camundongos mutantes *equilíbrio* e *mergulhador* induzidos pelo agente mutagênico n-ethyl-n-nitrosourea

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: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por absolutamente tudo, sei que estou onde estou e só consigo seguir em frente por Sua causa.

Agradeço aos meus animais, que deram a vida pelo meu experimento, sem eles nada disso seria possível e eu não estaria aqui.

Agradeço à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo por me dar a oportunidade de desenvolver esse trabalho.

Agradeço a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e a FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro, processo nº 2016/03180-8.

Agradeço às minhas pequeninas, Minnie e Lilica, por me ensinarem coisas que eu jamais aprenderia em livro algum.

Agradeço às minhas orientadoras, colaboradoras, incentivadoras e parceiras, Claudia Madalena Cabrera Mori, obrigada por acalmar minha ansiedade e me mostrar o caminho, Silvia Maria Gomes Massironi, obrigada por cada comentário, cada sugestão, Maria Martha Bernardi, obrigada por acreditar em mim, me mostrar seu amor pela ciência e ajudar a construir o meu e à Sandra Regina Alexandre-Ribeiro obrigada por cada conversa, cada detalhe e por fazer esse processo ser mais leve.

Agradeço à minha professora Esther Lopes Ricci Adari Camargo, se não fosse por você eu não estaria aqui, nunca vou conseguir te agradecer o suficiente.

Agradeço à todos os funcionários do Departamento de Patologia por toda ajuda. Agradeço em especial ao Herculano, Vagner, Milena, Adriana, Luciana, Mauro e Nelsinho.

Agradeço à todos os meus colegas de laboratório Dennis, Mariana e Nicássia.

Agradeço ao Pedro Navas-Suárez pela ajuda na leitura das lâminas histológicas.

Agradeço aos meus amigos que me apoiaram, me ajudaram e me fizeram rir, Julia, André, Luana, Natalia, Thiago e Thaísa.

Agradeço à minha família. Meu pai Giuseppe, que me ensinou tanto, minha tia Cristiana, que sempre me apoiou, minha Nonna, que sempre foi minha cúmplice, minha irmã Carolini, você definitivamente fez o caminho ser mais doce, e a minha mãe Amália, que é meu tudo, sempre acreditou em mim, me apoiou, incentivou, e sei que será assim para sempre. Tudo que eu faço é para orgulhar vocês. Amo vocês mais que tudo!

Agradeço à todos que não foram mencionados, mas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Por fim, agradeço e dedico essa dissertação à minha avó, Josefa, e ao meu Nonno, Costanzo, obrigada por terem feito de mim quem eu sou. Amo vocês!

RESUMO

MANES, M. Caracterização fenotípica e análise do sistema nervoso central dos camundongos mutantes *equilíbrio* e *mergulhador* induzidos pelo agente mutagênico n-ethyl-n-nitrosourea [Phenotypical characterization and central nervous system analysis of mutants *equilíbrio* and *mergulhador* induced by mutagenic agent n-ethyl-n-nitrosourea] 2017. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

O agente mutagênico N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) é amplamente utilizado para produzir novas mutações em camundongos, dando origem aos mutantes recessivos *equilíbrio* (*eqlb*), que possui uma mutação pontual no gene NADPH oxidase 3 (Nox3), cromossomo 17 e *mergulhador* (*mlh*), no gene Otopetrin 1 (Otop1), cromossomo 5; sendo que ambos apresentam alterações vestibulares. Devido à semelhança da função do aparelho vestibular humano e do camundongo, a análise comportamental desses modelos pode ser uma valiosa contribuição para identificar alterações no controle do equilíbrio e do movimento. Deste modo, com o objetivo caracterizar o comportamento dos mutantes *eqlb* e *mlh* foram realizados os seguintes testes: avaliação da atividade geral por observação direta no campo aberto, coordenação motora na trave elevada, labirinto em cruz elevada (LCE), para avaliar o comportamento do tipo ansioso, labirinto em T e reconhecimento de objetos para avaliar a memória, além do teste de suspensão pela cauda para verificar o comportamento do tipo depressivo. Os resultados mostraram que em comparação aos camundongos BALB/c, os mutantes *eqlb* e *mlh* apresentaram redução do reflexo auricular, reflexo de endireitamento, resposta ao toque, na locomoção e na frequência de levantar. A redução do reflexo auricular, da resposta ao toque e da redução do reflexo de endireitamento mostrou um possível prejuízo do sistema psicomotor. A redução da frequência de levantar provavelmente foi consequência da dificuldade motora dos camundongos mutantes. Os resultados do teste da trave elevada indicaram que os mutantes *eqlb* e *mlh* apresentaram um prejuízo motor principalmente relacionado à coordenação motora. O tempo de imobilidade aumentado no teste de suspensão pela cauda e a incapacidade de nadar em camundongos *eqlb* e *mlh* reforçaram o papel do sistema vestibular na manutenção da percepção de gravidade, movimento e equilíbrio.

Palavras-chave: Modelo animal. Disfunção vestibular. Comportamento. Nox3. Otop1.

ABSTRACT

MANES, M. Phenotypical characterization and central nervous system analysis of mutants *equilíbrio* and *mergulhador* induced by mutagenic agent n-ethyl-n-nitrosourea [Caracterização fenotípica e análise do sistema nervoso central dos camundongos mutantes *equilíbrio* e *mergulhador* induzidos pelo agente mutagênico n-ethyl-n-nitrosourea] 2017. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

The mutagenic agent N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) is widely used to produce new mutations in mice, giving origin to the *equilíbrio* (*eqlb*) which has a mutation in the NADPH oxidase 3 (Nox3) gene, chromosome 17 and *mergulhador* (*mlh*) in the gene Otopetrin 1 (Otop1), chromosome 5; both mutant strain showed vestibular impairment. Due to the similarity of the vestibular apparatus between human and mouse, the behavioral analysis of the mutant can be a valuable contribution to identify alterations involved in the control of balance and movement. This study aimed to characterize the behavior of *eqlb* and *mlh* mutant mice using the following behavioral tests: evaluation of the general activity by direct observation in the open field, motor coordination in the balance beam, elevated plus maze to evaluate the behavior of the anxious type, T-maze and recognition of objects to evaluate memory. In addition, tail suspension test was used to verify depressive like behavior. The results showed that in relation to the BALB/c mice, the mutants *eqlb* and *mlh* showed reduction of auricular reflex, surface-righting reflex, touch response, locomotion and rearing frequency. The reduction of the auricular reflex and the touch response pointed to the impairment of the psychomotor system, and the reduction of the surface-righting reflex showed a possible impairment of the psychomotor system. The reduction in the rearing frequency was, probably, a consequence of the motor impairment observed in the mutant strains. The results of the elevated plus maze test indicated that the mutants *eqlb* and *mlh* showed motor impairment mainly related to motor coordination. The increased immobility time in the tail suspension test and the inability to swim in *eqlb* and *mlh* mice reinforced the role of the vestibular system in maintaining the perception of gravity, movement, and balance.

Key words: Animal model. Vestibular dysfunction. Behavior. Nox3. Otop1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura do ENU: Grupo ethyl transferível marcado em vermelho.....	23
Figura 2	Protocolo de cruzamentos utilizado para o mapeamento de mutação recessiva viável e fértil.....	24
Figura 3	Imagem ilustrativa do aparato de campo aberto - vista lateral e superior.....	35
Figura 4	Imagem ilustrativa do campo aberto com objetos semelhantes.....	39
Figura 5	Imagem ilustrativa do campo aberto com objeto familiar e novo.....	40
Figura 6	Imagem ilustrativa do labirinto em T.....	42
Figura 7	Imagem ilustrativa do labirinto em cruz elevada.....	44
Figura 8	Imagem ilustrativa da trave elevada mostrando a luminária como estímulo aversivo e a caixa escura com maravalha da caixa moradia.....	45
Figura 9	Imagem ilustrativa do aparato de suspensão pela cauda.....	46
Figura 10	Imagem ilustrativa da cuba utilizada para o nado forçado.....	48
Figura 11	Atividade geral de camundongos <i>eq/b</i> e BALB/c em campo aberto.....	55
Figura 12	Parâmetros sensoriais de camundongos <i>eq/b</i> e BALB/c observados em campo aberto.....	56
Figura 13	Parâmetros psicomotores camundongos <i>eq/b</i> e BALB/c observados em campo aberto.....	57
Figura 14	Parâmetros ligados ao sistema nervoso autônomo de camundongos <i>eq/b</i> e BALB/c observados em campo aberto.....	58
Figura 15	Resultados obtidos para a atividade geral de camundongos <i>eq/b</i> e BALB/c observados em campo aberto.....	59

Figura 16	Desempenho de camundongos <i>eq/b</i> e BALB/c no teste de reconhecimento de objetos.....	60
Figura 17	Desempenho de camundongos <i>eq/b</i> e BALB/c no labirinto em cruz elevada.....	61
Figura 18	Desempenho de camundongos <i>eq/b</i> e BALB/c na trave elevada.....	62
Figura 19	Desempenho de camundongos <i>eq/b</i> e BALB/c no teste de suspensão pela cauda.....	62
Figura 20	Atividade geral de camundongos <i>mlh</i> e BALB/c em campo aberto.....	73
Figura 21	Parâmetros sensoriais de camundongos <i>mlh</i> e BALB/c observados em campo aberto.....	74
Figura 22	Parâmetro psicomotor de camundongos <i>mlh</i> e BALB/c observados em campo aberto.....	75
Figura 23	Parâmetros ligados ao sistema nervoso autônomo de camundongos <i>mlh</i> e BALB/c observados em campo aberto.....	75
Figura 24	Resultados obtidos para a atividade geral de camundongos <i>mlh</i> e BALB/c observados em campo aberto.....	76
Figura 25	Desempenho de camundongos <i>mlh</i> e BALB/c no teste de reconhecimento de objetos.....	77
Figura 26	Desempenho de camundongos <i>mlh</i> e BALB/c no labirinto em cruz elevada.....	78
Figura 27	Desempenho de camundongos <i>mlh</i> e BALB/c no labirinto em T.....	79
Figura 28	Desempenho de camundongos <i>mlh</i> e BALB/c na trave elevada.....	79
Figura 29	Desempenho de camundongos <i>mlh</i> e BALB/c no teste de suspensão pela cauda.....	80
Figura 30	Fotomicrografia do corte histológico do cerebelo de camundongos <i>mlh</i> e BALB/c; (A e B) x10; (C e D) x40.....	81

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Mutações induzidas por N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) em camundongos BALB/c.....	22
Quadro 2	Parâmetros da atividade geral e sensorial: descrição dos sinais observados e valores de escores. O valor base é apresentado pelo animal do grupo controle.....	36
Quadro 3	Parâmetros psicomotores: descrição dos sinais observados e valores de escores. O valor base é apresentado pelo animal do grupo controle.....	37
Quadro 4	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.....	38
Quadro 5	Escores atribuídos ao comportamento do camundongo na trave elevada.....	45

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	18
1.1 O COMPORTAMENTO ANIMAL E O CAMUNDONGO.....	18
1.2 O CAMUNDONGO COMO MODELO.....	20
1.3 N-ethyl-N-nitrosourea (ENU).....	21
1.4 SISTEMA VESTIBULAR.....	25
1.4.1 ANATOMIA E FISILOGIA DO SISTEMA VESTIBULAR.....	25
1.4.2 ESTRUTURAS E FISILOGIA DO SISTEMA OTOLÍTICO.....	26
1.5 MODELOS DE ESTUDO DAS DISFUNÇÕES VESTIBULARES CAUSADAS POR ALTERAÇÕES NAS OTOCÔNIAS.....	28
2. OBJETIVOS.....	31
2.1 OBJETIVO GERAL.....	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1 CAMUNDONGOS.....	33
3.2 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA.....	33
3.3 PROCEDIMENTOS.....	34
3.3.1 ATIVIDADE GERAL E OBSERVAÇÃO DIRETA DE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS.....	34
3.3.2 RECONHECIMENTO DE OBJETOS.....	39
3.3.3 LABIRINTO EM T.....	41
3.3.4 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADA.....	42
3.3.5 TRAVE ELEVADA.....	44
3.3.6 SUSPENSÃO PELA CAUDA.....	45
3.3.7 NADO FORÇADO.....	47
3.3.8 ANÁLISES ANÁTOMO E HISTOPATOLÓGICAS.....	48
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
CAPÍTULO I Estudos comportamentais e neuroquímicos do camundongo mutante <i>equilíbrio</i> (<i>Nox3^{eq/b}</i>) portador de déficit motor e sensorial.....	50
1. INTRODUÇÃO.....	51
2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	54
3. RESULTADOS.....	54

3.1	PARÂMETROS DE ATIVIDADE GERAL, SENSORIAIS E PSICOMOTORES DE CAMUNDONGOS <i>eq/b</i> E BALB/c.....	54
3.2	ATIVIDADE GERAL DE CAMUNDONGOS <i>eq/b</i> E BALB/c OBSERVADA EM CAMPO ABERTO.....	59
3.3	DESEMPENHO DE CAMUNDONGOS <i>eq/b</i> E BALB/c NO TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS.....	60
3.4	DESEMPENHO DE CAMUNDONGOS <i>eq/b</i> E BALB/c NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADA.....	60
3.5	DESEMPENHO DE CAMUNDONGOS <i>eq/b</i> E BALB/c NA TRAVE ELEVADA.....	61
3.6	DESEMPENHO DE CAMUNDONGOS <i>eq/b</i> E BALB/c NO TESTE DE SUSPENSÃO PELA CAUDA.....	62
3.7	DESEMPENHO DE CAMUNDONGOS <i>eq/b</i> E BALB/c NO TESTE DO NADO FORÇADO.....	63
4.	DISCUSSÃO.....	64
5.	CONCLUSÕES.....	69
CAPÍTULO II	Caracterização do comportamento do camundongo mutante <i>mergulhador (Otop1^{mlh})</i> com alterações do sistema vestibular.....	70
1.	INTRODUÇÃO.....	71
2.	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	73
3.	RESULTADOS.....	73
3.1	PARÂMETROS DE ATIVIDADE GERAL, SENSORIAIS E PSICOMOTORES DE CAMUNDONGOS <i>mlh</i> E BALB/c.....	73
3.2	ATIVIDADE GERAL DE CAMUNDONGOS <i>mlh</i> E BALB/c OBSERVADA EM CAMPO ABERTO.....	76
3.3	DESEMPENHO DE CAMUNDONGOS <i>mlh</i> E BALB/c NO TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS.....	77
3.4	DESEMPENHO DE CAMUNDONGOS <i>mlh</i> E BALB/c NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADA.....	77
3.5	DESEMPENHO DE CAMUNDONGOS <i>mlh</i> E BALB/c NO LABIRINTO EM T.....	78

3.6	DESEMPENHO DE CAMUNDONGOS <i>mlh</i> E BALB/c NA TRAVE ELEVADA.....	79
3.7	DESEMPENHO DE CAMUNDONGOS <i>mlh</i> E BALB/c NO TESTE DE SUSPENSÃO PELA CAUDA.....	80
3.8	DESEMPENHO DE CAMUNDONGOS <i>mlh</i> E BALB/c NO TESTE DO NADO FORÇADO.....	80
3.9	ANÁLISES ANÁTOMO E HISTOPATOLÓGICAS.....	81
4.	DISCUSSÃO.....	82
5.	CONCLUSÕES.....	86
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	88
	REFERÊNCIAS.....	90

1 INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 O COMPORTAMENTO ANIMAL E O CAMUNDONGO

O estudo científico do comportamento animal também é chamado de etologia, um termo utilizado pela primeira vez no século XIX pelo zoólogo francês Isidore Geoffroy Saint Hilaire. A palavra “etologia” é derivada do grego *ethos*, que significa “caráter”, há alguma semelhança com o termo “ética”, que é derivado da mesma palavra. Atualmente a palavra “etologia” não é mais tão utilizada como costumava ser, hoje em dia muitos autores costumam usar "comportamento animal" ou "biologia comportamental" quando se referem ao estudo científico do comportamento animal (BOLHIUS & GIRALDEAU, 2005).

A humanidade já estudava o comportamento animal muito antes da palavra “etologia” ser introduzida. Aristóteles, por exemplo, descreveu diversas observações a respeito do comportamento animal. O estudo do comportamento animal foi realizado de forma mais sistemática principalmente por zoólogos alemães e britânicos na virada do século XIX. Charles Darwin (1809-1882) dedicou um capítulo inteiro do seu clássico livro “A origem das espécies” ao que ele chamou de “instinto”. Já em 1873, um investigador amador britânico chamado Douglas Spalding registrou algumas observações sobre o comportamento de pintinhos domésticos, um fenômeno que mais tarde foi chamado de *imprinting*, um período crítico do desenvolvimento em recém-nascidos durante o qual laços maternos são estabelecidos e onde os animais absorvem mais intensamente o comportamento de outro animal. O *imprinting* é a forma mais duradoura de aprendizagem, um conceito utilizado pela primeira vez pelo naturalista Austríaco Konrad Lorenz (1903 – 1989), ele demonstrou em um trabalho realizado com gansos que os mesmos seguiam o primeiro ser que encontravam assim que saíam de seus ovos, ocorrendo uma ligação entre o filhote e ser que eles vissem. No início do século XX o

comportamento dos animais também foi estudado pelo fisiologista russo Ivan P. Pavlov (1927) e pelo do psicólogo americano Edward L. Thorndike (1911) no contexto de aprendizagem (BOLHIUS & GIRALDEAU, 2005).

Em meados do século XX, o estudo do comportamento animal tornou-se uma ciência independente, chamada de etologia, principalmente através dos esforços de dois biólogos, o austríaco Konrad Lorenz (1903-1989) e o holandês Niko Tinbergen (1907-1988). Em 1973, Lorenz e Tinbergen receberam o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina. Eles compartilharam o prêmio com Karl von Frisch (1886-1982), fisiologista austríaco e etólogo que havia sido pioneiro na investigação sobre a "dança das abelhas" (BOLHIUS & GIRALDEAU, 2005).

A experimentação animal tem uma importância imensurável na pesquisa científica. Apesar dos avanços em relação a métodos alternativos nos últimos anos (estudos *in silico* e *in vitro*, por exemplo), os modelos animais ainda são os mais utilizados, uma vez que fornecem informações sobre o organismo como um todo. Animais das mais variadas espécies têm sido utilizados no desenvolvimento científico, mas entre todas as espécies o camundongo é o modelo mais intensamente utilizado e o mais conhecido cientificamente (CHORILLI et al., 2007).

O camundongo é membro da classe Mammalia, ordem Rodentia, família Muridae, gênero *Mus*, espécie *Mus musculus*. Essa classificação é a mais aceita; porém, há controvérsias sobre espécies e subespécies criadas em laboratórios devido à presença de cruzamentos especiais, nos quais os animais apresentam alguns genes ou, até mesmo, cromossomos de espécies diferentes (CHORILLI et al., 2007).

O camundongo acompanha o homem por diversos milênios; existem registros desses animais com mais de 4 mil anos de idade e até mesmo na Bíblia (SANTOS, 2002). Somente no século XIX o camundongo se transformou em um animal de experimentação. Sua utilização como animal de laboratório deve-se ao fato de ser um animal pequeno, muito prolífero, ter período de gestação curto, ser de fácil domesticação e manutenção. Por todas essas características, tornou-se o mamífero mais usado na experimentação mundial (SANTOS, 2002).

1.2 O CAMUNDONGO COMO MODELO

O camundongo de laboratório é conhecido como o modelo animal mais importante na investigação de componentes genéticos e celulares que são relevantes para o entendimento de processos fisiológicos e patológicos em seres humanos (BULT et al., 2013; ADAMS et al., 2015).

No ano de 2002, pesquisadores ligados ao projeto “*Mouse Genome Sequencing Consortium*” publicaram o sequenciamento em alta resolução do genoma do camundongo da linhagem C57BL/6J. Cerca de 40% do genoma humano e do camundongo podem ser diretamente alinhados e 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 (WATERSTON et al., 2002; GUENÉT, 2004).

Atualmente, mais de quatro mil mutações espontâneas e induzidas por radiação ou agentes químicos, foram 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, doença hormonais ou metabólicas, defeitos nos olhos, disfunções auditivas, anemias de vários tipos e hemoglobinopatias, alterações neurológicas e neurodegenerativas e efeitos pleiotrópicos (International Mouse Strain Resource (IMSR): <http://www.findmice.org/>).

Historicamente as mutações têm sido essenciais para o entendimento dos complexos fenômenos biológicos. Em 1997, iniciou-se na Alemanha e Reino Unido um projeto de grande escala para indução de mutações em camundongos utilizando o agente mutagênico químico ENU (N-ethyl-N-nitrosourea). Os principais objetivos foram desenvolver uma nova infraestrutura para estudar a genômica funcional de mamíferos, prevendo a conclusão do sequenciamento completo do genoma humano pelo Projeto Genoma Humano. O ENU é conhecido como o agente químico mutagênico mais potente para camundongos, induzindo uma substituição de base

única na espermatogônia que é geneticamente herdada. Pela indução de mutações pontuais ao longo do genoma, os camundongos mutantes podem ser utilizados no estudo das funções biológicas das sequências de DNA genômico, bem como fornece novos modelos para estudo de doenças humanas (GONDO et al., 2010).

Conforme descrito na literatura, muitas destas mutações recapitulam fenótipos observados em doenças humanas, sendo consideradas modelos para a investigação de suas patogenias. Existem vários exemplos em que a cópia normal de um gene foi identificada a nível molecular a partir da cópia mutante (clonagem posicional) e, genes homólogos de outras espécies, incluindo o homem, puderam ser identificados (DAVIS & JUSTICE, 1998).

1.3 N-ethyl-N-nitrosourea (ENU)

Na década de 1970, pesquisadores do Laboratório Nacional de Oak Ridge começaram a explorar o uso do agente mutagênico ENU para produzir novas mutações em camundongos. Esses pesquisadores observaram que o ENU introduzia primariamente mutações pontuais em espermatogônias a uma frequência de $\sim 150 \times 10^{-5}$ por locus (RUSSELL et al., 1979).

No Brasil, Massironi et al. (2006) realizaram um estudo com o objetivo de produzir novas mutações em camundongos utilizando o agente mutagênico químico ENU. Como resultado dos tratamentos com ENU foram obtidas 11 mutações viáveis, entre recessivas e dominantes. Entre as mutações recuperadas encontram-se os mutantes *bate palmas*, *careca*, *cruza pernas*, *equilíbrio*, *fraqueza*, *mergulhador*, *nervoso*, *rodador* e *sem pêlo* (mutações recessivas), e *sacudidor de cabeça* e *anêmico* (mutações dominantes). O nome de cada mutação foi dado segundo a principal característica observada. Entre as mutações, pelo menos, cinco parecem ser originais e ocorreram em loci onde nenhum alelo mutante já havia sido relatado anteriormente (Quadro 1). Alguns dos mutantes obtidos nesse projeto (*careca*, *equilíbrio*, *fraqueza*, *rodador*, *sacudidor de cabeça* e *sem pêlo*) também já foram

mapeados e a caracterização comportamental desses modelos tem sido objeto de estudo de diversos autores (MORI et al., 2006; SALVAGNI et al., 2009; TORRES et al., 2010; ARIZA, 2011; POLICARPO et al., 2011).

Quadro 1- Mutações induzidas por N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) em camundongos BALB/c (MASSIRONI et al., 2006)

Mutação	Herança	Fenótipo principal	Cr	Abreviatura/gene	Referência
<i>Anêmico</i>	Dominante	Anemia hemolítica congênita regenerativa (macrocítica e hipocrômica), esplenomegalia, reticulocitose e hemossiderose.	7	<i>Hbb-b1^{Anem}/+</i>	MIYASHIRO et al. (2016)
<i>Bate palmas</i>	Recessiva	Movimento simulando o ato de bater palmas com os membros posteriores quando suspenso pela cauda.	15	<i>Kmt2D^{bapa}</i>	OLIVEIRA, et al. (2016)
<i>Careca</i>	Recessiva	Pelagem rala e esparsa devido ao ciclo acelerado de crescimento e queda de pelos, aumento de espessura da pele e folículos pilosos continuamente em anagênese.	7	<i>Carc (Cars – gene candidato)</i>	MASSIRONI et al. (2006)
<i>Cruza pernas</i>	Recessiva	Cruza os membros posteriores quando suspenso pela cauda, déficit motor e sensorial.	11	<i>crup (Taf15 – gene candidato)</i>	WADT et al. (2016)
<i>Equilíbrio</i>	Recessiva	Inclinação da cabeça, incapacidade de nadar, falta de coordenação motora e equilíbrio, excessiva proliferação de precursores neuronais cerebelares e desorganização da camada de células de Purkinje.	17	<i>Nox3^{eqib}</i>	ARIZA (2011); OVANDO (2014)
<i>Fraqueza</i>	Recessiva	Perda progressiva da coordenação motora e força muscular, letal com 4 a 6 semanas de idade.	1	<i>frqz (Dst – gene candidato)</i>	MASSIRONI et al. (2006)
<i>Mergulhador</i>	Recessiva	Inclinação da cabeça, incapacidade de nadar. Agenesia das otocônias sem afetar outras estruturas da orelha interna nem a audição.	5	<i>Otop1^{mlh}</i>	HURLE et al. (2003)
<i>Nervoso</i>	Recessiva	Ansiedade, hiperexcitabilidade, convulsões.	D	<i>nerv</i>	MASSIRONI et al. (2006)
<i>Rodador</i>	Recessiva	Andar em círculos, disfunção de equilíbrio e perda auditiva.	10	<i>Pcdh15^{roda}</i>	TORRES et al. (2013)
<i>Sacudidor de cabeça</i>	Dominante	Sacudir a cabeça.	15	<i>Sacc (Celsr1 – gene candidato)</i>	MASSIRONI et al. (2006); CARNEIRO (2006)
<i>Sem pelo (nude)</i>	Recessiva	Alopecia, agenesia do timo, imunodeficiente para linfócitos T, novo alelo da mutação nude.	11	<i>Foxn1^{sepe}</i>	MASSIRONI et al. (2006)

O ENU causa mutações randômicas por troca de uma única base pela alquilação direta dos ácidos nucléicos (JUSTICE et al., 1999). O grupo etil do ENU pode ser transferido a um oxigênio (preferencialmente em O₄-timina, O₂-timina ou O₂-cistina) (NOVEROSKE et al., 2000) ou a um nitrogênio nas moléculas de DNA (JUSTICE, 2000). O grupo etil transferido sozinho não constitui uma mutação, porém sua presença pode causar erro na identidade da base etilada. Durante a replicação do DNA, esses pares de bases etiladas causam erro na identificação das bases e dessa maneira a introdução de mutações pontuais, mas eventualmente podem ocorrer pequenas deleções (SHIBUYA & MORIMOTO, 1993; JUSTICE, 2000).

As mutações foram obtidas após a indução pelo agente mutagênico ENU (Figura 1), que foi dissolvido em tampão citrato-fosfato pH 5,0. Camundongos machos da linhagem BALB/c, na idade de 8 a 10 semanas receberam doses múltiplas de ENU (100 mg/kg, por injeção intraperitoneal [i. p.]), semanalmente, durante 3 semanas.

Figura 1- Estrutura do ENU: Grupo ethyl transferível marcado em vermelho

Fonte: (adaptado de ARIZA, 2007).

Após o tratamento, ocorreu um período de esterilidade (aproximadamente 20 semanas), antes que as espermatogônias mutadas repovoassem os testículos. Após recuperarem a fertilidade, os machos tratados foram cruzados com fêmeas BALB/c não tratadas. Os filhotes nascidos foram então observados para mutações dominantes na primeira geração (G1) e um protocolo de cruzamento de três gerações foi utilizado para recuperar mutações recessivas. Os machos G1 que não apresentavam mutações dominantes foram cruzados com fêmeas isogênicas

normais BALB/c e, então, retrocruzados com suas filhas G2. Após estes cruzamentos, a maior parte das mutações recessivas encontra-se em homozigose e pode ser observada na terceira geração G3 (Figura 2). A escolha da linhagem BALB/c para tratamento com ENU e a manutenção das mutações obtidas nesta mesma linhagem se deu por esta ser uma das linhagens isogênicas mais conhecida e utilizada em todo o mundo, outro fator importante é a resistência dos machos ao tratamento por ENU que podem receber doses eficazes do agente mutagênico (ARIZA, 2007).

Figura 2- Protocolo de cruzamentos utilizado para o mapeamento de mutação recessiva viável e fértil

Fonte: (MANES, 2017).

1.4 SISTEMA VESTIBULAR

1.4.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA DO SISTEMA VESTIBULAR

O sistema vestibular é filogeneticamente um dos mais antigos sistemas sensoriais nos vertebrados, ele também é responsável pela percepção da gravidade e dos movimentos, e pela manutenção do equilíbrio (HURLE et al., 2003). Conhecido como o órgão do equilíbrio da orelha interna, esse sistema constitui o nosso “sexto sentido” (ANGELAKI & CULLEN, 2008). Entre outras funções, o sistema vestibular é responsável pelo controle postural durante a locomoção. Sinais representando os movimentos rotacionais e translacionais da cabeça são transmitidos para os órgãos vestibulares. Essas informações dos receptores vestibulares são importantes também para a postura e para o modo de locomoção (DELLA JUSTINA, 2005).

O sistema vestibular pode ser dividido em central, composto por núcleos vestibulares localizados no assoalho do IV ventrículo cerebral e periférico, composto pelos órgãos otolíticos, responsáveis pelo equilíbrio estático, ou seja, pela noção da posição do corpo e da cabeça com relação ao espaço a nossa volta, e pelos canais semicirculares, que detectam acelerações angulares (HUNGRIA, 1991).

No sistema vestibular periférico está localizado o labirinto. Na realidade, existem dois labirintos, um ósseo, no qual fica alojado o segundo, o membranoso. O labirinto ósseo é composto por três partes: a cóclea, o vestíbulo e os canais semicirculares. A cóclea se apresenta como uma espiral em torno de um eixo; já o vestíbulo é uma cavidade oval situada entre a cóclea e os canais semicirculares, com duas vesículas membranosas- o sáculo e o utrículo; e os canais semicirculares são três e se dispõem de tal modo a ocupar os três planos geométricos, formando entre si um ângulo de aproximadamente 90° (DELLA JUSTINA, 2005).

1.4.2 ESTRUTURAS E FISIOLOGIA DO SISTEMA OTOLÍTICO

A orelha interna é um complexo sistema de espaços e estruturas no interior do osso temporal. Ela abriga dois sistemas sensoriais: a cóclea que contém os órgãos da audição, e o sistema vestibular, que comporta os órgãos responsáveis pelo equilíbrio. A porção da orelha interna que envolve o equilíbrio é o sistema vestibular e corresponde ao vestíbulo ósseo e a três canais semicirculares. A porção membranosa de cada sistema vestibular corresponde ao utrículo e sáculo (no interior do vestíbulo ósseo) e aos três dutos semicirculares (no interior de cada um dos três canais semicirculares). As porções auditivas e relacionadas ao equilíbrio da orelha interna estão interconectadas. A perilinfa e a endolinfa são comuns a ambos os sistemas. Portanto, distúrbios que afetam a orelha interna podem afetar ambos os sistemas sensoriais, ou seja, podem produzir tanto problemas do equilíbrio quanto perdas auditivas (ASSUMÇÃO & ATHERINO, 2015).

Os órgãos otolíticos são estruturas que percebem as forças lineares como da gravidade ou a aceleração em linha reta, experimentadas quando nos movemos neste sentido, eles reagem ao movimento cefálico linear e à inclinação estática, em relação ao eixo gravitacional. Os órgãos otolíticos diferem dos canais semicirculares em duas características básicas: eles reagem ao movimento linear e não ao angular e também respondem à aceleração e não a velocidade (HERDMAN, 2002).

O elemento básico de todos os transdutores vestibulares é a célula ciliada receptora. Os canais semicirculares e os órgãos otolíticos detectam as forças angulares e lineares. Cada célula receptora tem vários cílios finos, que se projetam do corpo celular para uma massa gelatinosa que a reveste, a membrana otolítica. O cílio mais longo é o cinocílio, que se localiza em um dos lados da célula receptora. Os demais cílios são os estereocílios, dispostos em uma série de altura crescente, à medida que se aproximam dos cinocílios. As forças geradas durante a movimentação fazem com que a membrana otolítica deslize, o que faz com que os cílios das células receptoras se curvem (HERDMAN, 2002).

A aceleração é traduzida em sinais neurais através das células ciliadas e é transmitida através de fibras aferentes para os neurônios vestibulares localizados no tronco cerebral. Ao integrar os sinais vestibulares com outras informações internas (sugestões proprioceptivas e motoras) e estímulos sensoriais externos (como a visão), o cérebro calcula a posição e direção da cabeça e do corpo no espaço (BERANECK & LAMBERT, 2009).

Cada labirinto consiste em tubos e sacos preenchidos por endolinfa, que contém estruturas receptoras. Os dois sacos especializados são o sacular e o utricular. Dentro de cada um está contida uma placa de células ciliadas receptoras especializadas e de tecido conjuntivo, a mácula. As duas máculas apresentam características macroscópicas semelhantes. Cada mácula leva o nome do saco do qual está localizada, de forma que em cada orelha interna existe uma mácula utricular e uma mácula sacular (HERDMAN, 2002).

Acima da mácula, embutida em uma camada de matriz acelular, encontram-se as otocônias, cristais de carbonato de cálcio, que atuam como massas inerciais sujeitas aos efeitos da gravidade e se deslocam em resposta a aceleração linear. É o movimento das otocônias que estimula as células ciliadas maculares a gerar potenciais de ação que são transmitidos para o cérebro (PAFFENHOLZ et al., 2004).

Cristais densos de carbonato de cálcio, as otocônias, estão embutidos na superfície externa da membrana otolítica. Na superfície interna desta membrana, os cílios das células ciliadas se projetam para o interior. A densidade da membrana otolítica propriamente dita é semelhante à da endolinfa circunjacente ($1,0 \text{ g/cm}^3$), mas a densidade das otocônias é quase três vezes maior ($2,7 \text{ g/cm}^3$). Estas duas estruturas receptoras são chamadas de órgãos otolíticos por possuírem construção similar e porque ambas são capazes de detectar forças que agem de acordo com os mesmos princípios físicos (HERDMAN, 2002). As otocônias são essenciais para o processamento correto da informação da posição do corpo (HURLE et al., 2003).

1.5 MODELOS DE ESTUDO DAS DISFUNÇÕES VESTIBULARES CAUSADAS POR ALTERAÇÕES NAS OTOCÔNIAS

Os órgãos do equilíbrio, localizados dentro da orelha interna, regiões sensoriais vestibulares, atuam despercebidamente e continuamente, de uma forma quase perfeita, fornecendo ao encéfalo as informações sobre a posição e os movimentos cefálicos. Até que esses órgãos apresentem algum tipo de deficiência, ninguém realmente avalia a sua importância na vida cotidiana (HERDMAN, 2002).

Para uma maior compreensão do equilíbrio e da percepção da gravidade, pesquisadores analisaram mutações que especificamente afetam o sistema vestibular. Três loci clássicos são conhecidos que conferem ausência congênita e específica de otocônia em camundongos afetados. Um locus, *tilted* (*tlt*), está localizado no cromossomo 5 e foi identificado como otopetrin 1 (*Otop1*) (HURLE et al., 2003), esta também é a mutação do *mlh* (MASSIRONI et al., 2006). Um outro locus, o *head tilted* (*het*), está localizado no cromossomo 17 (PAFFENHOLZ et al., 2004), assim como o *eqlb* (MASSIRONI et al., 2006). Estes animais apresentam a morfogênese da otocônias alterada, porém a funcionalidade do sistema auditivo normal (PAFFENHOLZ et al., 2004).

Em camundongos, dos 150 loci murinos ligados à surdez ou a algum tipo de disfunção vestibular, apenas três (*tilted*, *tilted head*, e *head tilted*) afetam especificamente o desenvolvimento das otocônias sem causar surdez (HURLE et al., 2003).

O desenvolvimento embrionário, a anatomia e fisiologia dos órgãos auditivos e vestibulares estão intrinsecamente relacionados, o que dificulta o estudo da função vestibular além da audição. Diversos genes que afetam a função auditiva foram identificados e caracterizados, porém o estudo de genes que afetam a função vestibular ainda é incipiente, em parte pela escassez de modelos animais (HURLE et al., 2003).

Nesse sentido, o presente estudo caracterizou o comportamento dos camundongos mutantes *mergulhador* (*Otop1^{mlh}*), descrito por Hurle et al. (2003), e *equilíbrio* (*Nox3^{eqlb}*).

Visando uma melhor organização dos dados e redação dos artigos científicos para publicação, os resultados obtidos foram apresentados em dois capítulos, conforme segue: 1) Estudos comportamentais do camundongo mutante *equilíbrio* (*Nox3^{eq/b}*) portador de déficit motor e sensorial e 2) Caracterização do comportamento do camundongo mutante *mergulhador* (*Otop1^{mlh}*) com alterações do sistema vestibular.

2 OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o fenótipo comportamental dos camundongos mutantes *equilíbrio* (BALB/c *Nox3^{eq/b}*) e *mergulhador* (BALB/c *Otop1^{mlh}*), induzidos por ENU, por meio da avaliação comportamental.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar por observação direta parâmetros da atividade geral em campo aberto, parâmetros sensoriais, psicomotores e ligados ao sistema nervoso central e autônomo de camundongos mutantes e compará-los aos de camundongos BALB/c;
- Avaliar a memória e o aprendizado de camundongos mutantes no teste de reconhecimento de objetos e no labirinto em T e compará-los aos camundongos BALB/c;
- Avaliar o comportamento do tipo ansioso de camundongos mutantes no labirinto em cruz elevado e compará-los aos camundongos BALB/c;
- Avaliar a coordenação motora de camundongos mutantes na trave elevada e compará-los aos camundongos BALB/c;
- Avaliar o comportamento do tipo depressivo de camundongos mutantes no teste de suspensão pela cauda e no teste do nado forçado e compará-los aos camundongos BALB/c;
- Avaliar o encéfalo camundongos mutantes *mergulhador* e compará-los aos camundongos BALB/c.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CAMUNDONGOS

Foram utilizados camundongos machos com 8 semanas de idade, sendo 12 *eqlb*, 9 *mlh* e 22 BALB/c como controles, totalizando 43 indivíduos.

Os camundongos foram mantidos em gaiolas de polipropileno fosco, medindo 30x20x13cm. A sala dos animais foi mantida com temperatura de 22 ± 2 °C e umidade relativa do ar de 55-65%. A iluminação era artificial, controlada por “timer”, com ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, iniciado às 7:00 AM. Ração comercial para camundongos (Nuvilab - CR1, Quimtia, PR, Brasil) e água filtrada e autoclavada foram oferecidas *ad libitum* durante todo o experimento. As condições de alojamento e manejo dos animais estavam de acordo com as normas éticas internacionais, em especial àquelas do NRC (2011).

Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FVMZ/USP e receberam protocolo nº 3930220116.

3.2 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA

A sequência de testes foi feita do menos para o mais estressante com um intervalo de uma semana. A ordem dos testes foi 1) atividade geral de campo aberto, 2) reconhecimento de objetos, 3) labirinto em T, 4) labirinto em cruz elevado, 5) trave elevada, 6) suspensão pela cauda e 7) nado forçado. Todos os aparatos foram limpos com álcool 5% a fim de eliminar qualquer tipo de pista olfativa menos a cuba do nado forçado, que teve a água trocada a cada animal.

3.3 PROCEDIMENTOS

3.3.1 ATIVIDADE GERAL E OBSERVAÇÃO DIRETA DE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS

Em um ambiente novo os animais tendem a explorá-lo ou podem ficar imóveis. Essa última reação é denominada *freezing* (congelamento), que se traduz pela diminuição do comportamento exploratório e pela diminuição da atividade geral. A atividade geral pode ser avaliada pelo campo aberto; esse aparelho é considerado um bom teste para quantificação dos efeitos comportamentais da ansiedade e do estresse (BELZUNG & GRIEBEL, 2001).

A caracterização fenotípica foi avaliada conforme descrito por Barrella et al. (2012), com modificações. Parâmetros relacionados à atividade geral, ao sistema sensorial (como irritabilidade, reflexo auricular, reflexo corneal, aperto da cauda, resposta ao toque), ao sistema psicomotor (queda do trem posterior) parâmetros relacionados ao sistema nervoso central (como cauda em pé,) e ao sistema nervoso autônomo (micção e defecação) foram avaliados. Escores de 1 a 5 foram utilizados para cada parâmetro, exceto para micção e defecação, *grooming* e locomoção que foram contados: os números de poças e cíbalas ou bolos fecais, o número de eventos que ocorreu a autolimpeza e o tempo de locomoção.

Ao final das observações, os escores foram somados individualmente e empregados para os cálculos estatísticos.

Figura 3- Imagem ilustrativa do aparato de campo aberto - vista lateral e superior

Fonte: (ZANATTO, D. A, 2017). *

* Dennis Albert Zanatto, Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

Quadro 2- 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.	1 – não se move 2- animal dá um passo 3 – animal dá meia volta na caixa de observação 4 – animal dá duas voltas na caixa (base) 5- animal andando com agilidade
SISTEMA SENSORIAL			
	Irritabilidade	Assoprar o animal e tocá-lo levemente para observar reação.	1 – ausente 5 - 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.	1 - orelha totalmente em pé (ausente) 2- orelha um pouco mais em pé (base) 3 - orelha metade em pé 4 - orelha colada ligeiramente na cabeça 5 - orelha colada à cabeça.
	Aperto de Cauda	Apertar com uma pinça a região próxima a ponta da cauda com bastante intensidade	1 – sem reação 2 – move-se ligeiramente 3 – se move mais rápido 4 – se move e pula (base) 5 – 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.	1 - olhos permanecem abertos 2 - quase não responde 3 – responde um pouco 4 - fecha os olhos pela metade na aproximação da pinça (base)
	Resposta ao Toque	Tocar o animal com uma pinça a um intervalo de tempo mais prolongado (mais de 15 segundos) e examinar a resposta.	1 - não se move 2 - apresenta pouco movimento 3 - animal dá um passo 4 - anda com dificuldade 5 - andar com agilidade (base).

Fonte: (adaptado de BRITO, 1994).

Quadro 3- 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
PSICOMOTOR			
	Trem Posterior	Verificar se o animal está com a postura normal ou se o trem posterior está caído (intensidade, modo de andar).	1 - ausente (base) 2 - queda do trem posterior pouco visível 3 - queda do trem posterior visível, animal anda com dificuldade 4 - trem posterior visivelmente caído, animal anda com dificuldade 5 - 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.	1 - não se move 2 - volta-se lentamente com dificuldade 3 - volta-se lentamente 4 - volta-se mais rápido 5 - volta-se imediatamente com agilidade (base)
	Força de Agarrar	Colocar o animal em cima de uma grade e avaliar a intensidade em que se segura na mesma.	1 - não se agarra à grade 2 - segura inicialmente e larga a grade 3 - segura a grade, por um tempo mais prolongado, mas a solta 4 - segura firmemente a grade, mas solta 5 - segura firmemente a grade e não a solta (base).

Fonte: (adaptado de BRITO, 1994).

Quadro 4- 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	Cauda em pé	Verificar se a cauda está normal ou ereta.	1 – normal (base) 5 - ereta
SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO	Micção	Número de micções.	Número de poças de urina
	Defecação	Número de bolos fecais.	Número de cíbalas

Fonte: (adaptado de BRITO, 1994).

3.3.2 RECONHECIMENTO DE OBJETOS

O reconhecimento de objetos é considerado uma tarefa envolvida com a aquisição de memória declarativa ligada à atividade hipocampal (BROADBENT et al., 2010). A memória de reconhecimento de objetos é a capacidade de discernir entre objetos que tenham sido previamente encontrados e objetos que não o tenham. Roedores têm uma tendência natural em gastar mais tempo explorando novos objetos, ao invés dos já conhecidos, podendo assim, essa preferência, ser utilizada como um índice de reconhecimento de objetos (CRUZ, 2009).

O teste de reconhecimento de objetos foi realizado no campo aberto, como descrito no item acima. Dois objetos semelhantes foram colocados equidistantes um do outro (Figura 4).

Figura 4 - Imagem ilustrativa do campo aberto com objetos semelhantes

Fonte: (ZANATTO, D. A, 2017).

Os animais foram submetidos a um pré-teste de 5 minutos. Após um período de 2 e 24 horas os animais foram submetidos ao teste com um objeto familiar do pré-teste e um objeto novo, respectivamente (Figura 5). Os objetos eram peças de plástico. Nos testes foi registrado e utilizado como parâmetro o tempo gasto para explorar o objeto novo.

Figura 5 - Imagem ilustrativa do campo aberto com objeto familiar e novo

Fonte: (ZANATTO, D. A, 2017).

3.3.3 LABIRINTO EM T

Este teste comportamental, juntamente com outros testes como o labirinto aquático de Morris, labirinto em Y, labirinto de Barnes, entre outros, é usado para avaliar a memória espacial de roedores. De acordo com Deacon e Rawlins (2006) este teste é muito sensível à disfunção do hipocampo. O labirinto em T foi feito de madeira com três braços em forma de T (90°). Os braços tinham 25 cm de largura e as paredes tinham 14 cm de altura. Um dos braços tinha um compartimento inicial de 10 cm de comprimento separado do resto do braço por uma parede removível. Os animais foram colocados na área de início durante 10s. Após esse período de tempo inicial a barreira foi elevada, e foi permitido ao camundongo explorar o labirinto durante 30 segundos. Uma vez que o animal entrou em um dos braços de livre escolha, a barreira foi inserida para bloquear o animal naquele braço durante 30 segundos. Posteriormente, o camundongo foi reposicionado na área de início, iniciando outra sessão. Se o animal não entrasse em nenhum dos braços de livre escolha após 30 segundos, ele foi colocado novamente na área de início e a sessão foi reiniciada. Cinco sessões foram realizadas para cada camundongo. Para cada sessão, foi avaliada a primeira escolha do camundongo nos braços de livre escolha, isto é, se o camundongo entrou primeiro nos braços esquerdo ou direito. O parâmetro analisado foi a porcentagem (%) de alternância entre os braços esquerdo e direito, que foi sempre avaliada em relação ao braço visitado na sessão anterior. (KIRSTEN et al., 2015).

Este modelo baseia-se na propensão natural dos roedores a alternar entre os braços visitados em cada ensaio ao longo de uma série de ensaios sucessivos (DEACON & RAWLINS, 2006). Assim, uma maior porcentagem de alternância entre os braços foi considerada como comportamento normal dos camundongos, enquanto um menor número de alternâncias indicou inflexibilidade cognitiva e comportamento repetitivo. Para análise estatística, estes dados foram transformados em escores: 0 = sem alternâncias, visitando repetidamente o mesmo braço para todas as cinco sessões; 1 = uma alternância; 2 = duas alternâncias; 3 = três

alternâncias; 4 = quatro alternâncias, isto é, sempre alternando entre os braços visitados para todas as cinco sessões.

Figura 6 – Imagem ilustrativa do labirinto em T

Fonte: (ZANATTO, D. A, 2017).

3.3.4 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADA

O labirinto em cruz elevada (LCE), um aparelho concebido pela primeira vez por File e colaboradores (PELLOW et al., 1985) e posteriormente descrito por Komada et al. (2008), é um dos testes mais utilizados para medir o comportamento do tipo ansioso. O modelo para o estudo de ansiedade foi descrito por Pellow et al. (1985) e usado para camundongos por Lister (1987). Assim como o campo aberto, o labirinto em cruz elevada é outro teste extremamente utilizado em roedores para

avaliação de ansiedade. Trata-se de um labirinto em forma de cruz, de madeira, constituído por dois braços abertos medindo 30 cm de comprimento, cada um, em oposição a dois braços fechados de medidas iguais, mas com paredes laterais de 16 cm de altura. Na intersecção entre os braços abertos e os braços fechados forma-se um espaço central, denominado centro. O aparelho encontra-se a 50 cm do chão (Figura 7) Segundo Barnett (1956; 1958), os roedores têm preferência natural por lugares próximos a superfícies verticais, provavelmente por ficarem menos expostos a predadores.

Cada animal foi colocado na parte central do aparelho e observado por 5 minutos.

Os parâmetros medidos foram:

- Número de entradas nos braços abertos, sendo considerada uma entrada quando o animal colocava as quatro patas dentro deste compartimento;
- Número de entradas nos braços fechados, sendo considerada uma entrada seguindo o mesmo critério acima citado, porém agora no braço fechado;
- Tempo de permanência nos braços abertos, em segundos;
- Tempo de permanência nos braços fechados, em segundos.

Figura 7 - Imagem ilustrativa do labirinto em cruz elevada

Fonte: (ZANATTO, D. A, 2017).

3.3.5 TRAVE ELEVADA

A trave elevada consiste em um equipamento utilizado para avaliar a coordenação motora. Este modelo foi adaptado do descrito por Luong et al (2011). Esse aparato era constituído por uma trave de madeira de 1,5cm de largura, e de 150 cm de comprimento apoiada a 20 cm do chão em duas plataformas em forma de triângulo em cada extremidade (Figura 8). Inicialmente, para se habituar, cada animal foi treinado a andar sobre a trave por 5 minutos, durante 2 dias consecutivos antes do dia do teste. Na plataforma inicial havia uma luz, funcionando como estímulo aversivo e na plataforma final uma caixa escura com maravalha da caixa moradia, servindo de abrigo e estímulo para que o animal atravessasse. No primeiro e no segundo dia de treino, cada camundongo foi colocado sobre a plataforma inicial por cinco minutos, durante esse tempo o animal explorava a trave. Os animais foram submetidos a três sessões de 5 minutos cada. No terceiro dia foi realizado o teste, os animais foram colocados na plataforma inicial e tinham que atravessar (LUONG,

et al., 2011). Para análise estatística, esses dados foram transformados em escores (Quadro 5).

Quadro 5 - Escores atribuídos ao comportamento do camundongo na trave elevada

Escore	Comportamento
1	O animal não passa pela trave.
3	O animal cai, ou atravessa a trave com erros.
7	O animal atravessa a trave sem erros.

Figura 8- Imagem ilustrativa da trave elevada mostrando a luminária como estímulo aversivo e a caixa escura com maravalha da caixa moradia

Fonte: (ZANATTO, D. A, 2017).

3.3.6 SUSPENSÃO PELA CAUDA

Tradicionalmente, o teste de suspensão da cauda é utilizado para avaliar o potencial efeito antidepressivo de fármacos e avaliação de outras situações que se espera que afetem os comportamentos relacionados à depressão em camundongos (CAN et al., 2011). Contudo, esta tarefa provou ser eficaz na avaliação da

deficiência de equilíbrio de camundongos mutantes com disfunção vestibular (SHEFER et al., 2015).

Os camundongos foram suspensos pela cauda e gentilmente posicionados em um suporte de madeira localizado a 100 cm do solo, por meio de fitas adesivas fixadas a 1 cm do final da cauda (Figura 9). O tempo em que o animal permaneceu imóvel foi registrado durante seis minutos.

Figura 9- Imagem ilustrativa do aparato de suspensão pela cauda

Fonte: (ZANATTO, D. A, 2017).

3.3.7 NADO FORÇADO

Este teste foi primeiramente descrito para ratos (PORSOLT et al., 1977) e posteriormente adaptado para camundongos (PORSOLT et al., 1978). Roedores quando são obrigados a nadar, após um período inicial de atividade vigorosa, adotam uma postura imóvel, movendo-se somente o necessário para manter a cabeça para fora da água. A imobilidade dos animais foi interpretada como um indicativo de que era impossível sair daquela situação e a fim de economizar energia o animal adota esta posição, visto, antropomorficamente, como se o animal desistisse de escapar daquela situação estressante (CASTAGNÉ et al., 2011). O teste consiste em colocar o animal em um tanque, contendo água limpa, a uma profundidade de 25 cm, com temperatura 23-25°C, durante 6 minutos (CAN et al., 2012). Após o término do teste, cada animal foi seco com uma toalha. Os camundongos que não foram capazes de nadar foram imediatamente resgatados para evitar afogamento. Todas as sessões foram filmadas.

Figura 10- Imagem ilustrativa da cuba utilizada para o nado forçado

Fonte: (ZANATTO, D. A, 2017).

3.3.8 ANÁLISES ANÁTOMO E HISTOPATOLÓGICAS

Dezesseis camundongos, sendo 8 *mlh* e 8 BALB/c, com 8 semanas foram submetidos à eutanásia utilizando o anestésico inalatório isoflurano. Foi realizada a necropsia para avaliação macro e microscópica dos encéfalos. Os encéfalos foram colhidos, fixados em formol a 10% e rotineiramente processados para inclusão em parafina. Cortes histológicos de 5µm foram corados com hematoxilina e eosina para exame histopatológico.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com auxílio do software GRAPHPAD PRISM 5.03. Os testes estatísticos utilizados foram o teste U de Mann-Whitney ou teste t de Student, pareado e não pareado. O nível de significância para as análises foi considerado $p < 0,05$.

CAPÍTULO I

ESTUDOS COMPORTAMENTAIS DO CAMUNDONGO MUTANTE
EQUILÍBRIO (*Nox3^{EQLB}*) PORTADOR DE DÉFICIT MOTOR E SENSORIAL

1. INTRODUÇÃO

A utilização do camundongo como modelo de doenças humanas contribuiu de forma expressiva para as pesquisas (PAIGEN, 1995). Modelos animais de doenças humanas fornecem a oportunidade de analisarmos seu processo patogênico mesmo que não sejam doenças idênticas às humanas.

Camundongos são especialmente adequados para a pesquisa graças a sua similaridade genética com o homem, pela conveniência de mantê-los em laboratório, seu ciclo de vida relativamente curto e sua similaridade com os mamíferos como o homem (CHORILLI et al., 2007). Um benefício adicional do camundongo como organismo modelo é a possibilidade de se controlar a sua genética. Existe uma ampla variedade de linhagens de camundongos isogênicos disponíveis que apresentam uma grande variabilidade genética, permitindo seu rigoroso controle genético. (MOORE, 1999).

Historicamente as mutações têm sido extremamente importantes para o entendimento de complexos fenômenos biológicos. Apesar do atual banco de dados de camundongos mutantes, composto na sua maioria por animais nocaute, ser uma fonte extremamente valiosa de modelos animais, apenas uma pequena proporção do número total de genes de mamíferos é representada. Isso ocorre pois para se obter um camundongo nocaute existe a necessidade de se conhecer a sequência do gene, o que limita essa técnica aos genes já conhecidos. A partir disso, esse vazio tem sido preenchido com novas técnicas de mutagênese usando-se agentes mutagênicos como o ENU, que representam uma ferramenta eficiente para a geração de um grande número de mutantes (BODE, 1984; JUSTICE et al., 1999).

Os camundongos mutantes recessivos denominados *equilíbrio* (*eqlb*), que apresentaram deficiência de equilíbrio e incoordenação motora, foram identificados primeiramente através de seu comportamento dentro da gaiola moradia, e foram denominados “*tatu*”, já que mantinham a cabeça enterrada na maravalha, e também pendiam a cabeça para um dos lados. Outra avaliação mostrou um comportamento diferente ao serem levantados pela cauda. O comportamento normal seria que o animal mantivesse seu corpo reto, porém isso não aconteceu com os camundongos *equilíbrio*, que se inclinam lateralmente. Foi a partir da observação desse fenótipo

que se levantou a hipótese que esses camundongos poderiam apresentar problemas de coordenação motora e possivelmente falta de equilíbrio (ARIZA, 2007).

O fenótipo apresentado por esse mutante nos levou à hipótese de que a mutação gerada poderia afetar o desenvolvimento do cerebelo, região do sistema nervoso central que controla a execução dos movimentos e o equilíbrio. A avaliação do comportamento de camundongos adultos selvagens e mutantes no teste do *rotarod* mostrou que o tempo de permanência dos animais *eqlb* estava significativamente diminuído em relação aos camundongos BALB/c (ARIZA, 2007).

Análises histológicas do cerebelo dos camundongos mutantes revelaram formação anormal das camadas celulares, com desorganização da camada de células de Purkinje, o principal tipo de neurônio do cerebelo. As análises histológicas também revelaram uma camada granular externa (CGE) mais espessa nos camundongos mutantes, quando comparados com cerebelos de camundongos selvagem de mesma idade. Ensaios de incorporação de [3H] -timidina demonstraram que o espessamento dessa camada pode ser atribuído ao alto índice de proliferação observado nos cerebelos dos camundongos mutantes. O mapeamento genético da mutação, utilizando marcadores microssatélites polimórficos, localizou a mutação no cromossomo 17, em uma sub-região delimitada pelo marcador D17Mit267 (3,31Mb) e o limite centromérico (ARIZA, 2011). A partir do sequenciamento do exoma a mutação foi localizada no gene Nox3 (NADPH oxidase 3) (OVANDO, 2014).

O gene Nox3 dos camundongos codifica uma oxidase NADPH que é expressa principalmente na orelha interna e atua no desenvolvimento e função do sistema vestibular. A proteína ligante 6-transmembranar NADPH, codificada pelo Nox3, interage com a proteína 2-transmembranar codificada pelo Cyba e com a proteína citosólica codificada pelo Nox1 para formar uma parte, ou a totalidade, do complexo NADPH oxidase funcional, que é capaz de transportar elétrons através das membranas biológicas para as moléculas de oxigênio (O_2) formando o superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e a cascata subsequente das espécies reativas de oxigênio. Mutações de qualquer um desses três componentes tem um efeito profundo sobre a capacidade de detectar aceleração linear ou gravidade, manifestados por anormalidades no comportamento. Anormalidades comportamentais adicionais incluem um desempenho prejudicado no rotarod, na trave elevada, incapacidade de

nadar posição inclinada da cabeça, hiperatividade e o ato de andar em círculos (FLAHERTY et al., 2011).

2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram avaliados os camundongos mutantes induzidos por ENU *eq/b* e seus controles BALB/c. Foram utilizados camundongos machos com 8 semanas de idade, sendo 12 animais mutantes e 12 camundongos do grupo controle, totalizando 24 indivíduos.

3. RESULTADOS

3.1 PARÂMETROS DE ATIVIDADE GERAL, SENSORIAIS E PSICOMOTORES DE CAMUNDONGOS *eq/b* E BALB/c

A Figura 11 ilustra a atividade geral de camundongos *eq/b* e BALB/c. O teste U de Mann-Whitney indicou redução significativa da atividade geral de camundongos equilíbrio em relação aqueles BALB/c ($p= 0,009$).

Figura11- Atividade geral de camundongos *eq/b* e BALB/c em campo aberto

Fonte: (MANES, 2017).

A Figura 12 ilustra os parâmetros sensoriais de camundongos *eq/b* e BALB/c. O teste U de Mann-Whitney mostrou que redução significativa na irritabilidade ($p < 0,0001$, painel 12A), no reflexo auricular ($p < 0,0005$, painel 12B), na resposta ao toque ($p < 0,0001$, painel 12D) e no aperto de cauda ($p = 0,0003$, painel 12E) de camundongos *eq/b* em relação aos BALB/c. Não foram observadas diferenças significantes entre os grupos no reflexo corneal ($p = 0,28$, painel 12C).

Figura 12- Parâmetros sensoriais de camundongos *eq/b* e BALB/c observados em campo aberto

Fonte: (MANES, 2017).

A Figura 13 ilustra os parâmetros psicomotores camundongos *eq/b* e BALB/c. Nota-se que houve aumento significativo na queda de trem posterior ($p=0,0047$, painel 13A) e redução significativa nos escores do reflexo de endireitamento ($p=0,0069$, painel 13B) de camundongos *eq/b* em relação aos BALB/c.

Figura 13- Parâmetros psicomotores camundongos *eq/b* e BALB/c observados em campo aberto

Fonte: (MANES, 2017).

A Figura 14 ilustra os parâmetros ligados ao sistema nervoso autônomo de camundongos *eq/b* e BALB/c. Verifica-se que houve aumento significativo nos escores de cauda em pé ($p=0,03$, painel 14A) e redução significativa no número de defecações ($p=0,02$, painel 14C) de camundongos *eq/b* em relação aos BALB/c. Não houve diferenças significantes no parâmetro frequência de micção ($p=0,57$, painel 14B).

Figura 14- Parâmetros ligados ao sistema nervoso autônomo de camundongos *eqlb* e BALB/c observados em campo aberto

Fonte: (MANES, 2017).

3.2 ATIVIDADE GERAL DE CAMUNDONGOS *eq/b* E BALB/c OBSERVADA EM CAMPO ABERTO

A Figura 15 ilustra os resultados obtidos para a atividade geral de camundongos *eq/b* e BALB/c observada em campo aberto. Nota-se que houve redução significativa nas frequências de locomoção ($p < 0,001$, painel 15A) e levantar ($p < 0,0003$, painel 15B) de camundongos *eq/b* e BALB/c. Não foram observadas diferenças significantes na frequência de grooming de equilíbrio e BALB/c observada em campo aberto ($p = 0,26$, painel 15C).

Figura 15- Resultados obtidos para a atividade geral de camundongos *eq/b* e BALB/c observados em campo aberto

Fonte: (MANES, 2017).

3.3 DESEMPENHO DE CAMUNDONGOS *eq/b* E BALB/c NO TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS

A figura 16 ilustra o comportamento de camundongos *eq/b* e BALB/c no teste de reconhecimento de objetos. Não foram observadas diferenças significantes ($p=0,2501$).

Figura 16 - Desempenho de camundongos *eq/b* e BALB/c no teste de reconhecimento de objetos

Fonte: (MANES, 2017).

3.4 DESEMPENHO DE CAMUNDONGOS *eq/b* E BALB/c NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADA

A Figura 17 ilustra o desempenho de camundongos *eq/b* e BALB/c no labirinto em cruz elevada. Nota-se um aumento significativo em relação ao número de entradas nos braços abertos ($p= 0,0247$, painel 17A) e ao tempo de permanência nos braços abertos ($p= 0,0076$, painel 17C). Nota-se também uma redução

significante em relação ao número de entradas nos braços abertos ($p= 0,0088$, painel 17B) e ao tempo de permanência nos braços fechados $p=0,0213$, painel 17D).

Figura 17 - Desempenho de camundongos *eq/b* e BALB/c no labirinto em cruz elevada

Fonte: (MANES, 2017).

3.5 DESEMPENHO DE CAMUNDONGOS *eq/b* E BALB/c NA TRAVE ELEVADA

A Figura 18 ilustra o desempenho de camundongos *eq/b* e BALB/c na trave elevada. Nota-se que em relação aos camundongos BALB/c, aqueles do grupo *eq/b* apresentaram menores escores de coordenação motora ($p = 0,0003$).

Figura 18 - Desempenho de camundongos *eq/b* e BALB/c na trave elevada

Fonte: (MANES, 2017).

3.6 DESEMPENHO DE CAMUNDONGOS *eq/b* E BALB/c NO TESTE DE SUSPENSÃO PELA CAUDA

A Figura 19 ilustra o desempenho de camundongos *eq/b* e BALB/c no teste de suspensão pela cauda. Nota-se um aumento significativo em relação ao tempo de imobilidade dos camundongos BALB/c ($p < 0,0001$)

Figura 19 - Desempenho de camundongos *eq/b* e BALB/c no teste de suspensão pela cauda

Fonte: (MANES, 2017).

3.7 DESEMPENHO DE CAMUNDONGOS *eq/b* E BALB/c NO TESTE DO NADO FORÇADO

Observou-se que todos os camundongos *eq/b* não foram capazes de nadar e afundavam logo após serem colocados no tanque com água, devido às alterações vestibulares descritas para estes mutantes.

4. DISCUSSÃO

O camundongo mutante recessivo denominado *equilíbrio* (*eq/b*), originado a partir de mutagênese química utilizando ENU, foi objeto de estudo de outros autores (ARIZA, 2007; ARIZA, 2011). No presente trabalho realizou-se uma sequência de testes comportamentais a fim de entender melhor o fenótipo da mutação. A comparação com camundongos BALB/c foi feita uma vez que o mutante *eq/b* foi induzido a partir de camundongos desta linhagem, sendo então o camundongo BALB/c considerado como grupo controle (ARIZA, 2007). Foram observados parâmetros de motilidade, sensoriais, psicomotores e ligados ao sistema nervoso autônomo na tentativa de caracterizar o comportamento do camundongo *eq/b*. Neste sentido, foram observadas diferenças claras no comportamento destes animais quando comparadas ao controle BALB/c.

A atividade geral dos camundongos *eq/b* que reflete a motilidade espontânea dos mesmos, incluindo comportamentos exploratórios e de locomoção, apresentou-se reduzida em relação aos camundongos BALB/c. Esta redução pode ter sido consequência do prejuízo em parâmetros psicomotores desde que estes animais mostraram aumento significativo na queda do trem posterior. Por outro lado, a percepção do próprio corpo como demonstrado no teste do reflexo de endireitamento, também foi menor nestes animais. Este reflexo está ligado ao ajuste quadrúpede de animais. Portanto, é possível que a maior queda do trem posterior observada possa também ser consequência de um menor ajuste postural dos animais. Ainda, este fato pode ter contribuído para a redução da atividade geral acima citada.

Existem dois tipos de equilíbrio, o estático e o dinâmico. O equilíbrio estático se refere à manutenção da posição do corpo, em especial da cabeça, em relação à força da gravidade, os movimentos corpóreos que estimulam os receptores para o equilíbrio estático incluem a inclinação da cabeça e a desaceleração ou aceleração linear do corpo. Já o equilíbrio dinâmico se trata da manutenção da posição do

corpo, principalmente da cabeça, em relação a aceleração ou desaceleração rotacional (TORTORA, 2012).

O camundongo *eq/b*, na análise histopatológica, apresentou uma formação anormal das camadas celulares do cerebelo, com desorganização da camada de células de Purkinje, e espessamento da camada granular externa (ARIZA, 2007). O cerebelo é uma das estruturas responsáveis pela coordenação motora e pelo equilíbrio, sendo assim as alterações descritas acima acabam por justificar os resultados encontrados.

Observou-se também prejuízo evidente no sistema sensorial dos mutantes em relação aos BALB/c. De fato, verificou-se redução na irritabilidade, reflexo auricular, reposta ao toque e ao aperto de cauda.

Uma das funções críticas do sistema auditivo é determinar a localização de um som identificando sua origem e localização espacial (HEFFNER & HEFFNER, 1992). Este reflexo permite a rotação da cabeça com compensação da visão de tal forma que as imagens ficam estabilizadas. Este controle se dá pelo reflexo vestibulo-ocular (LORENT apud TOLLIN, 2009). É interessante que animais cujas orelhas se movimentam independentemente do corpo, tal como em gatos e ratos, servem de antenas facilitando a recepção do som (TOLLIN et al., 2009). Portanto, a redução do reflexo auricular nos mutantes pode sugerir prejuízos não só auditivos, mas também em relação a predação, se porventura vivessem em ambiente natural.

O mapeamento genético do *eq/b* identificou a mutação no gene NADPH oxidase 3 (Nox3), cromossomo 17, descrito na literatura como responsável por defeitos vestibulares e na formação das otocônias (PAFFENHOLZ et al., 2004). Sabe-se que o sistema vestibular, juntamente com os impulsos captados pela visão e nos receptores proprioceptivos e resposta muscular reflexa são os mecanismos mais importantes do sistema nervoso pela manutenção do equilíbrio e pelo controle da postura (LOTH et al., 2008).

Outros parâmetros que poderiam limitar a vida destes mutantes em ambiente natural são suas respostas reduzidas ao toque e ao aperto de cauda. Respostas à estimulação corporal são também importantes mecanismos de defesa contra agressões do meio ambiente. Concorda com este fato que os mutantes

apresentaram diminuição da irritabilidade quando estimulados. Assim, se as respostas a estímulos ambientais e ao próprio corpo estão prejudicadas, sinalizam que estes mutantes podem ser alvo de predação pela sua incapacidade de perceber estímulos em seus organismos e daqueles oriundos do meio ambiente. Além disto, houve também redução da resposta ao aperto de cauda, que está ligada a processos dolorosos, os quais representam aviso importante ao organismo de uma possível lesão.

A sensação de dor representa um papel extremamente importante na proteção do corpo, uma vez que avisa praticamente todos os tipos de lesões e produz as reações musculares adequadas à remoção do corpo com o estímulo lesivo (TORTORA, 2012).

Estes dados em conjunto sugerem pouca adaptabilidade dos mutantes tanto aos estímulos ambientais quanto ao seu próprio organismo. Quanto aos parâmetros ligados ao sistema nervoso autônomo, nota-se aumento da cauda em pé e da defecação. O aumento da expressão da cauda em pé nos mutantes pode representar ativação de receptores nicotínicos ou interferência com sistemas opióides (FONCK et al., 2003). No entanto, serão necessários estudos adicionais para a confirmação destas hipóteses. Quanto à defecção, também tida como defecação reativa, é um sinal claro de interferência com o sistema nervoso autônomo, já conhecido e relatado desde há muito tempo na literatura (SLATER, 1976). Desta forma, a redução da defecação poderá representar redução da atividade deste sistema.

O modelo de atividade geral em campo aberto foi proposto por Calvin Hall em 1934 para avaliação da emocionalidade de ratos frente a um ambiente novo. A exposição ao campo aberto para medida de emocionalidade é feita em condições de alta intensidade de luz e, por vezes, de altos níveis de som tendo, portanto, conotações aversivas. Modificações na contingência experimental foram propostas em 1981 por Bernardi e colaboradores retirando-se o estímulo sonoro e reduzindo a luminosidade ambiental, fato que permitiu que os ratos emitissem comportamento exploratório em detrimento àqueles de natureza emocional. Neste trabalho os camundongos foram observados neste aparelho em condições menos agressivas tais como, baixa luminosidade, ausência de sons, e assim, a frequência de locomoção e levantar dos animais passaria a expressar outros tipos de

comportamento quais sejam, o exploratório e o motor (BERNARDI et al., 1981; BATATINHA et al., 1995). Os presentes resultados mostram então redução nas frequências de locomoção e levantar dos animais o que concorda com as alterações psicomotoras já descritas.

Camundongos têm uma tendência natural de gastar mais tempo explorando objetos desconhecidos em relação aqueles com os quais já tenham tido algum contato, podendo esta preferência ser empregada para avaliação de memória (MACHADO et al., 2012). No teste de reconhecimento de objetos, os mutantes *eq/b* não apresentaram deficiência de memória não espacial em relação ao grupo controle.

Este resultado está de acordo com os descritos na literatura, em trabalhos que descreveram camundongos com sistema vestibular lesionado quimicamente, sugerindo que a informação otolítica não desempenha um papel fundamental no processo de memória não espacial (MACHADO et al., 2012).

O teste de labirinto em cruz elevada é um importante instrumento de pesquisa na área experimental para estudos de comportamentos relacionados à ansiedade. É um dos modelos mais utilizados e é baseado em respostas incondicionadas a ambientes possivelmente perigosos. Os estudos iniciais com o labirinto em cruz-elevada foram realizados por Handley e Mithani (1984) quando investigavam uma variedade de agonistas e antagonistas alfa-adrenérgicos. Os autores constataram que ansiolíticos como diazepam aumentavam a proporção entre entradas nos braços abertos e o total de entradas, e agentes ansiogênicos como a picrotoxina diminuía esta proporção, concluindo que o labirinto em cruz elevado seria um modelo válido de comportamento motivado pelo medo (HANDLEY; MITHANI, 1984).

Apesar da premissa inicial que associava a aversão dos braços abertos à altura, observou-se, porém, que a tigmotaxia é um importante fator para a aversão gerada pelos braços abertos no labirinto em cruz elevado (TREIT et al., 1993). A tigmotaxia refere-se à tendência de roedores de se esquivarem de áreas abertas, desconhecidas e potencialmente perigosas.

Observou-se que o mutante *eq/b* apresentou um menor tempo de permanência nos braços abertos. Este dado sugere que os mutantes *eq/b*

apresentaram um maior nível de ansiedade com relação aos animais do grupo controle.

Em concordância com o prejuízo motor observado na redução nas frequências de locomoção e levantar dos mutantes, estão os dados da trave elevada. De fato, os dados obtidos neste equipamento também são indicativos de um prejuízo motor dos animais, particularmente com relação à coordenação motora.

O teste de suspensão pela cauda é utilizado para avaliar o comportamento do tipo depressivo. O animal suspenso pela cauda entra em estado de imobilidade, ou desamparo aprendido, uma vez que não consegue escapar da situação imposta (ROMANINI et al., 2006). Os animais mutantes ficaram mais tempo imóveis com relação aos do grupo controle, sugerindo possíveis sinais de depressão. Outra possibilidade é de que a disfunção otolítica desses animais, tenha levado a pouca adaptabilidade proprioceptiva e aos estímulos ambientais na percepção de sua posição em relação ao espaço.

Normalmente, a discriminação entre os mutantes e os camundongos BALB/c é determinada através da incapacidade de nadar desses animais uma vez que o animal é incapaz de detectar disfunções otolíticas (ORNITZ et al., 1998). Isto ocorre devido à falta do senso de gravidade e a ausência de noção que indica a superfície (MACHADO et al., 2012). Os mutantes foram submetidos ao teste do nado forçado e, assim como o esperado, não conseguiram nadar, afundando quase imediatamente após serem colocados no tanque com água. Os animais que não foram capazes de nadar foram imediatamente resgatados para evitar que se afogassem.

5. CONCLUSÕES

Baseando-se nos resultados do presente trabalho podemos concluir que o camundongo mutante *eq/b* apresenta:

- redução da atividade geral em campo aberto, particularmente em relação à locomoção e frequência de levantar indicando possíveis prejuízos nos parâmetros psicomotores;
- redução na irritabilidade, reflexo auricular, resposta ao toque, reflexo de endireitamento, e uma maior queda de trem posterior, indicando prejuízos sensoriais;
- menor nível de ansiedade no labirinto em cruz elevada, traduzido pelo maior número de entradas e maior tempo de permanência nos braços fechados;
- deficiência motora, particularmente com relação à coordenação motora, observado no teste da trave elevada;
- possíveis sinais de depressão no teste de suspensão pela cauda, e também sugerindo falha na capacidade em reconhecer a localização espacial do corpo;
- incapacidade de nadar devido à falta do senso de gravidade e a ausência de noção de propriocepção.

CAPÍTULO II

CARACTERIZAÇÃO DO COMPORTAMENTO DO CAMUNDONGO MUTANTE
MERGULHADOR (OTOP 1^{MLH}) COM ALTERAÇÕES DO SISTEMA
VESTIBULAR

1. INTRODUÇÃO

A informação sensorial fornecida pelo sistema vestibular é fundamental nos processos de memória espacial em animais experimentais e humanos (BRANDT et al., 2005; MACHADO et al., 2012). No entanto, apesar de várias informações terem sido descritas sobre a deficiência auditiva hereditária, o papel dos genes envolvidos na disfunção vestibular foi menos explorado (JONES & JONES, 2014). O sistema vestibular é conhecido como o órgão de equilíbrio da orelha interna, constituído por três canais semi-circulares que detectam movimentos de rotação e dois órgãos otolíticos (o utrículo e o sáculo) que detectam gravidade e acelerações lineares (BESSON et al., 2005; ANGELAKI & CULLEN, 2008). O utrículo e o sáculo podem fornecer informações sobre o movimento linear às regiões cerebrais envolvidas na memória espacial, como o hipocampo (MACHADO et al., 2012). Sendo parte do sistema vestibular, a membrana otoconial e a matriz orgânica interna da otocônia consistem em glicoproteínas e complexos de glicosaminoglicanos sulfatados na forma de proteoglicanos (ORNITZ et al., 1998). As otocônias são cruciais para o correto processamento da orientação e da informação posicional (HURLE et al., 2003). Os camundongos com agenesia das otocônias são incapazes de sentir a direção do vetor gravitacional e não conseguem nadar normalmente. Por outro lado, os modelos de camundongo que têm uma pequena quantidade de otocônias apresentam uma resposta de comportamento normal ou próxima do normal (JONES & JONES, 2014).

Nos camundongos, o gene *Otopetrin 1* (*Otop 1*) é expresso a partir do 13º dia embrionário em epitélios maculares que recobrem a membrana gelatinosa do utrículo e do sáculo, e está ausente nos epitélios não sensoriais (HURLE et al., 2011). Esse gene também é expresso em vários outros tecidos tais como timo, coração e rins, entre outros (HURLE et al., 2003). A *Otop1* é uma proteína transmembranar essencial para a mineralização das otocônias, que atua como um sensor da concentração extracelular de cálcio envolvida no aumento dos níveis intracelulares durante a mineralização das otocônias (KIM et al., 2010). Enquanto nos seres humanos os distúrbios vestibulares hereditários atribuídos a alterações na *Otop1* ainda não são conhecidos, existem pelo menos dois alelos mutantes de

Otop1 em camundongos, *tilted* (*tlt*) e *mergulhador* (*mlh*), que resultam em agenesia não sindrômica das otocônias e, conseqüentemente, alterações de equilíbrio (HURLE et al., 2011, KIM et al., 2011). Um dos alelos do gene Otop 1, *mlh*, surgiu a partir de um processo de indução de mutações utilizando ENU em fundo genético BALB/c (MASSIRONI et al., 2006) exibindo incapacidade de nadar e ausência de otocônias assim como o *tlt*, um mutante espontâneo mantido em fundo genético C57BL/6. Ambos os camundongos mutantes são indistinguíveis considerando os fenótipos; no entanto, a análise genotípica mostrou que o alelo do *tlt* contém uma troca de C₄₇₆ - A no exon 3, levando a uma substituição da Alanina₁₅₁ por Glutamina; já o alelo *mlh* apresenta uma troca de T₁₂₄₇ - A no exon 6 levando a uma substituição da Leucina₄₀₈ por Glicina (HURLE et al., 2003).

A análise molecular realizada em outro mutante do mesmo gene mostrou que o alelo *ied* corresponde a uma mutação de splicing (T → A) no exon 2 e o fenótipo observado nos camundongos mutantes *ied/ied* é semelhante ao fenótipo observado nos outros dois mutantes descritos (BESSON et al., 2005).

Estudos anteriores mostraram que os camundongos mutantes *tlt* apresentaram anormalidades comportamentais como incapacidade de nadar (ORNITZ et al., 1998) e perda sensorial (JONES et al., 2004). No presente estudo propõe-se pela primeira vez uma sequência de testes comportamentais para avaliar conjuntamente parâmetros relacionados à atividade geral, sistema sensorial, sistema psicomotor e sistema nervoso autônomo, além de medir a aquisição de memória declarativa, comportamento ansioso, memória espacial, coordenação motora, comportamento de natação e comprometimento do equilíbrio dos camundongos mutantes *mlh*.

2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram avaliados os camundongos mutantes induzidos por ENU *mlh* e seus controles BALB/c. Foram utilizados camundongos machos com 8 semanas de idade, sendo 9 animais mutantes e 10 camundongos do grupo controle, totalizando 19 indivíduos.

3. RESULTADOS

3.1 PARÂMETROS DE ATIVIDADE GERAL, SENSORIAIS E PSICOMOTORES DE CAMUNDONGOS *mlh* E BALB/c

A Figura 20 ilustra a atividade geral de camundongos *mlh* e BALB/c. O teste U de Mann-Whitney não indicou redução significativa da atividade geral de camundongos *mlh* em relação aqueles BALB/c ($p= 0,3991$).

Figura 20- Atividade geral de camundongos *mlh* e BALB/c em campo aberto

Fonte: (MANES, 2017).

A Figura 21 ilustra os parâmetros sensoriais de camundongos *mlh* e BALB/c. O teste U de Mann-Whitney mostrou que redução significativa no reflexo auricular ($p= 0,0177$, figura 21A), e na resposta ao toque ($p= 0,0020$, figura 21C). Não foram observadas diferenças significantes entre os grupos no reflexo corneal ($p =0,9616$, figura 21B) e no aperto de cauda ($p= 0,3428$, figura 21D).

Figura 21- Parâmetros sensoriais de camundongos *mlh* e BALB/c observados em campo aberto

Fonte: (MANES, 2017).

A Figura 22 ilustra um parâmetro psicomotor de camundongos *mlh* e BALB/c. Nota-se que houve uma redução nos escores do reflexo de endireitamento ($p=0,0243$) de camundongos *mlh* em relação aos BALB/c.

Figura 22- Parâmetro psicomotor de camundongos *mlh* e BALB/c observados em campo aberto

Fonte: (MANES, 2017).

A Figura 23 ilustra os parâmetros ligados ao sistema nervoso autônomo de camundongos *mlh* e BALB/c. Verifica-se uma redução significativa no parâmetro frequência de micção ($p = 0,0365$, figura 23A). Não houve diferenças significantes no parâmetro frequência de defecação ($p = 0,2841$, figura 23B).

Figura 23- Parâmetros ligados ao sistema nervoso autônomo de camundongos *mlh* e BALB/c observados em campo aberto

Fonte: (MANES, 2017)

3.2 ATIVIDADE GERAL DE CAMUNDONGOS *mlh* E BALB/c OBSERVADA EM CAMPO ABERTO

A Figura 24 ilustra os resultados obtidos para a atividade geral de camundongos *mlh* e BALB/c observada em campo aberto. Nota-se que houve redução significativa nas frequências de levantar ($p = 0,0012$, figura 24B) e locomoção ($p = 0,0036$, figura 24A) de camundongos *mlh* e BALB/c. Não foram observadas diferenças significantes na frequência de grooming de *mlh* e BALB/c observada em campo aberto ($p = 0,0539$, figura 24C).

Figura 24- Resultados obtidos para a atividade geral de camundongos *mlh* e BALB/c observados em campo aberto

Fonte: (MANES, 2017).

3.3 DESEMPENHO DE CAMUNDONGOS *mlh* E BALB/c NO TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS

A figura 25 ilustra o comportamento de camundongos *mlh* e BALB/c no teste de reconhecimento de objetos. O teste não indicou diferenças entre as respostas dos animais mutantes e de seu grupo controle ($p=0,5466$).

Figura 25 - Desempenho de camundongos *mlh* e BALB/c no teste de reconhecimento de objetos

Fonte: (MANES, 2017).

3.4 DESEMPENHO DE CAMUNDONGOS *mlh* E BALB/c NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADA

A Figura 26 ilustra o desempenho de camundongos *mlh* e BALB/c no labirinto em cruz elevada. Nota-se que em relação aos camundongos BALB/c, aqueles do grupo *mlh* permaneceram por mais tempo nos braços fechados ($p= 0,4067$, figura 26D). Não foram observadas diferenças significantes entre o número de entradas nos braços abertos ($p=0,0562$, figura 26A), o número de entradas nos braços fechados ($p=0,1301$, figura 26B) e o tempo de permanência nos braços abertos ($p=0,0604$, figura 26C).

Figura 26- Desempenho de camundongos *mlh* e BALB/c no labirinto em cruz elevada

Fonte: (MANES, 2017).

3.5 DESEMPENHO DE CAMUNDONGOS *mlh* E BALB/c NO LABIRINTO EM T

A Figura 27 ilustra o desempenho de camundongos *mlh* e BALB/c no labirinto em T. Nota-se que em relação aos camundongos BALB/c, aqueles do grupo *mlh* apresentaram menores escores ($p = 0,0123$).

Figura 27- Desempenho de camundongos *mlh* e BALB/c no labirinto em T

Fonte: (MANES, 2017).

3.6 DESEMPENHO DE CAMUNDONGOS *mlh* E BALB/c NA TRAVE ELEVADA

A Figura 28 ilustra o desempenho de camundongos *mlh* e BALB/c na trave elevada. Nota-se que em relação aos camundongos BALB/c, aqueles do grupo *mlh* apresentaram menores escores de coordenação motora ($p = 0,0002$).

Figura 28- Desempenho de camundongos *mlh* e BALB/c na trave elevada

Fonte: (MANES, 2017).

3.7 DESEMPENHO DE CAMUNDONGOS *mlh* E BALB/c NO TESTE DE SUSPENSÃO PELA CAUDA

A Figura 29 ilustra o desempenho de camundongos *mlh* e BALB/c no teste de suspensão pela cauda. Nota-se que em relação aos camundongos BALB/c, aqueles do grupo *mlh* apresentaram um maior tempo de imobilidade ($p = 0,0004$).

Figura 29- Desempenho de camundongos *mlh* e BALB/c no teste de suspensão pela cauda

Fonte: (MANES, 2017).

3.8 DESEMPENHO DE CAMUNDONGOS *mlh* E BALB/c NO TESTE DO NADO FORÇADO

Observou-se que todos os camundongos *mlh* não foram capazes de nadar e afundavam logo após serem colocados no tanque com água, devido às alterações vestibulares descritas para estes mutantes.

3.9 ANÁLISES ANÁTOMO E HISTOPATOLÓGICAS

A Figura 30 ilustra os cortes histológicos do cerebelo de camundongos *mlh* e BALB/c. Nota-se que em relação aos camundongos BALB/c, aqueles do grupo *mlh* não apresentaram alterações morfológicas na camada de células de Purkinje.

Figura 30- Fotomicrografia do corte histológico do cerebelo de camundongos *mlh* e BALB/c; (A e B) x10; (C e D) x40

Fonte: (MANES, 2017).

4. DISCUSSÃO

No presente estudo descreveu-se fenótipo comportamental do mutante *mlh*, induzido por ENU, que afeta o gene *Otop1* e resulta da ausência de otocônias, utilizando uma sequência de testes comportamentais. Estes mutantes exibem características complexas que envolvem deficiência sensorial, psicomotor e de memória espacial. Além disso, como outros mutantes descritos para o mesmo gene (ORNITZ et al., 1998; BESSON et al., 2005), os mutantes *mlh* são incapazes de nadar.

Com relação à atividade geral os mutantes *mlh* apresentaram uma redução na locomoção e no levantar. Da mesma forma, o mutante *ied* (*inner ear defect*), induzido por ENU, descrito por Besson et al. (2005) mostraram redução no levantar em relação ao grupo controle. Em relação à distância percorrida no teste do campo aberto, os mutantes *ied/ied* apresentaram atividade semelhante ao grupo controle. Por outro lado, os resultados demonstraram que o tempo de locomoção dos mutantes *mlh* foi inferior ao grupo controle. Os diferentes resultados em relação à locomoção dos mutantes *ied* e dos mutantes *mlh* podem ser explicados pelas diferenças do background genético e alelos distintos, uma vez que o alelo *ied* foi estudado em um fundo híbrido (B6C3Fe) e o mutante *mlh* foi estudado em fundo BALB/c. Em geral, ambos mutantes parecem ter um comprometimento da locomoção devido a defeitos de equilíbrio.

Provavelmente, a redução da locomoção e do comportamento de levantar, juntamente com a diminuição da coordenação motora observada na análise do teste da trave elevada, nos mutantes *mlh*, resultou do comprometimento da propriocepção, reforçando o papel das otocônias na manutenção da percepção da gravidade, movimento e equilíbrio. O mutante *tlt* também apresentou falta de equilíbrio relacionado com a falta de otocônias (CRAPON De CAPRONA et al., 2004). Por outro lado, a diminuição da locomoção e do comportamento de levantar não pode ser atribuída a lesões musculares, uma vez que a avaliação da força de agarrar dos mutantes *mlh* não apresentou diferença com relação ao grupo controle. Neste sentido, o reflexo de agarrar representa o estado do tônus muscular quando o

camundongo é suspenso pela cauda colocado em contato com um objeto no qual o animal possa se segurar (FEATHER-SCHUSSLER & FERGUSON, 2016). Outros autores descreveram que, em condições experimentais, a extirpação do labirinto poderia ser responsável pela fraqueza dos membros observada em ratos. (KASRI et al., 2004).

Outro aspecto observado com relação à atividade geral foi o aumento do comportamento de limpeza dos mutantes *mlh*. A execução do comportamento de limpeza necessita da integridade de movimentos estereotipados e coordenados. Kalueff et al. (2010) revisaram a neurobiologia do comportamento de limpeza em roedores e seu valor para a neurociência translacional. Acredita-se que os episódios de limpeza em roedores recapitulam comportamentos repetitivos patológicos (KAS et al., 2014; AMODEO et al., 2016). Os roedores preparam-se de uma maneira ritualística onde os padrões de limpeza são executados sequencialmente e sistematicamente, assemelhando-se aos comportamentos compulsivos que são expressos em algumas desordens psiquiátricas. O comportamento de limpeza teria então conotações de um padrão motor repetitivo que não tem um componente cognitivo predominante como com o aprendizado reverso. (KAS et al., 2014). Além disso, a limpeza é modulada por condições novas e estressantes (KALUEFF et al., 2010) e menores níveis de estimulação ambiental também aumentam o comportamento de limpeza. Portanto, dependendo da contingência a resposta do comportamento de limpeza pode ter diversas interpretações.

A análise conjunta dos resultados da locomoção e levantar em que se observa redução dos mesmos e o aumento no comportamento de limpeza podem sugerir redução de níveis de emocionalidade frente à novidade do ambiente. Concordam com esta assertiva a redução do comportamento tipo ansioso observado no labirinto em cruz elevada dos mutantes.

Em relação ao teste de coordenação motora observada na trave elevada, os mutantes *mlh* apresentaram comportamento semelhante ao mutante *t/t* (CRAPON De CAPRONA et al., 2004). Ambos os mutantes encostaram o ventre na trave elevada durante a travessia e movimentavam suas caudas de um lado para o outro. Além disso, eles cruzavam a barra em um ritmo mais lento e com mais erros com relação ao grupo controle, que geralmente cruzava a trave de forma rápida e com a cauda em pé. Assim, o mutante *mlh* apresentou escores menores que os controles demonstrando deficiência de coordenação motora. Portanto, tanto qualitativa como

quantitativamente a coordenação motora dos mutantes mostrou-se prejudicada.

Frente aos resultados anteriores, a redução da resposta no labirinto em T, no qual os mutantes não exploraram o aparato, e o aumento da imobilidade no teste de suspensão pela cauda, podem ser atribuídas também, pelo menos em parte, à deficiência motora. No entanto, o labirinto em T também avalia memória espacial. Vários autores mostraram que o hipocampo é necessário para o desempenho eficiente na memória espacial, como a alternância espontânea no labirinto em T, mas não na memória não-espacial como na tarefa de reconhecimento de objetos (MACHADO et al., 2012; BROADBENT et al., 2004; DEACON & RAWLINS, 2006; BARKER & WARBURTON, 2011).

Presentemente, o mutante *mlh* também demonstrou um desempenho reduzido na alternância do labirinto em T em relação ao grupo controle. Portanto, pode-se sugerir que este desempenho reduzido do mutante *mlh* na alternância do labirinto em T estaria relacionado com a perda da transmissão de estímulos vestibulares na modulação da atividade do neurônio hipocampal em consequência à falta das otocônias. Em concordância, os camundongos *het*, deficientes em otocônias não alternaram entre os braços como esperado, sugerindo que os gravissensores são importantes para a formação de memória espacial (MACHADO et al., 2012). Da mesma forma, os animais submetidos à labirintectomia bilateral desenvolveram prejuízos de desempenho a longo prazo na tarefa do labirinto radial (RUSSELL et al., 2003).

Estudos com relação à memória declarativa usando o teste de reconhecimento de objetos revelaram que tanto os camundongos *tilted* quanto os camundongos *het* apresentaram um comportamento normal nesta tarefa (MACHADO et al., 2012) de forma semelhante ao observado no camundongos *mlh*. A este respeito, Crapon De Caprona et al. (2004) sugeriu que os camundongos mutantes não apresentaram sinais de comprometimento da aprendizagem quando treinados durante dias consecutivos para atravessar uma barra de equilíbrio mostrando uma melhoria ao longo do tempo. As semelhanças entre os camundongos *mlh* e o grupo controle no teste de reconhecimento de objetos podem ser interpretadas na mesma direção. De acordo com um estudo no qual camundongos apresentavam o sistema vestibular quimicamente lesionado, outros

autores também demonstraram que as otocônias não influenciam na memória não-espacial (BESNARD et al., 2012).

O teste de suspensão pela cauda e o teste do nado forçado são usualmente utilizados para investigar a atividade de fármacos antidepressivos (CRYAN et al., 2005; PETIT-DEMOULIERE et al., 2005). Por outro lado, estes mesmos testes foram utilizados para avaliar o equilíbrio e a coordenação motora do camundongo mutante com alterações vestibulares *headbanger (Hdb)*, demonstrando claramente déficits de equilíbrio nesses animais (SHEFER et al., 2010; SHEFER et al., 2015). Consequentemente, estes testes necessitam tanto de habilidades motoras quanto de equilíbrio intactos. Além disso, foi descrito que mutantes com ausência de otocônias são incapazes de nadar (ORNITZ et al., 1998; BESSON et al., 2005; MACHADO et al., 2012). Assim, o tempo de imobilidade aumentado e a incapacidade de nadar em camundongos *mlh* reforçam o papel das otocônias na percepção de gravidade, movimento e manutenção do equilíbrio

Com relação ao desempenho no labirinto em cruz elevado Machado et al. (2012) descreveram que camundongos *het/het* deficientes de otocônias não foram capazes de realizar esta tarefa. Neste estudo, apesar da ausência das otocônias, os mutantes *mlh* apresentaram um comportamento de ansiedade reduzido. De fato, os camundongos *mlh* permaneceram e entraram mais nos braços abertos. É possível que a redução do sistema sensorial como um todo (diminuição do reflexo auricular, resposta ao toque e irritabilidade) possa ser responsável, pelo menos em parte, por esse efeito inesperado. Em conclusão, em nossos camundongos mutantes *mlh*, a deficiência de otocônias reduziu o comportamento motor, sensorial, e de aprendizado espacial, além de impossibilitar a natação, provavelmente pelo comprometimento do equilíbrio. No que diz respeito à redução do comportamento do tipo ansioso mais estudos precisam ser realizados para esclarecer o mecanismo subjacente a este efeito.

Com relação as análises anátomo-histopatológicas, não foram observadas alterações morfológicas no cerebelo dos mutantes *mlh*, com oito semanas de idade, utilizando-se a coloração de HE. No entanto, serão necessárias análises adicionais, de regiões específicas, capazes de fornecer informações mais detalhadas sobre as possíveis alterações dos mutantes estudados.

5. CONCLUSÕES

Baseando-se nos resultados do presente trabalho podemos concluir que o camundongo mutante *mlh* apresenta:

- redução no reflexo auricular e na reposta ao toque, indicando prejuízos sensoriais;
- prejuízo no sistema psicomotor como mostrado no teste do reflexo de endireitamento, sugerindo distúrbio de propriocepção;
- deficiência motora, particularmente com relação à coordenação motora, observado no teste da trave elevada;
- possível prejuízo com relação à memória operacional no labirinto em T;
- possíveis sinais de depressão no teste de suspensão pela cauda, e também sugerindo falha na capacidade em reconhecer a localização espacial do corpo;
- incapacidade de nadar devido à falta do senso de gravidade e a ausência de noção de propriocepção;
- ausência de alterações morfológicas no cerebelo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Baseando-se nos resultados do presente trabalho podemos concluir que, apesar das mutações estarem localizadas em genes distintos, os camundongos *eqlb* e *mlh* apresentaram fenótipo semelhante, caracterizado por: redução no reflexo auricular e na resposta ao toque, indicando prejuízos sensoriais; prejuízo no sistema psicomotor como mostrado no teste do reflexo de endireitamento, sugerindo distúrbio de propriocepção; deficiência motora, particularmente com relação à coordenação motora, observado no teste da trave elevada; falha na capacidade em reconhecer a localização espacial do corpo no teste de suspensão pela cauda; incapacidade de nadar devido à falta do senso de gravidade e a ausência de noção de propriocepção.

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.
- ANGELAKI, D.E., CULLEN, K.E. Vestibular system: the many facets of a multimodal sense. **Annu Rev Neurosci** 31: 125–150, 2008.
- AMODEO, D.A.; RIVERA, E.; DUNN, J.T.; RAGOZZINO, M.E. M100907 attenuates elevated grooming behavior in the BTBR mouse. **Behav Brain Res**. Oct 15; 313:67-70. doi: 10.1016/j.bbr.2016.06.064., 2016.
- ARIZA, CAROLINA BATISTA. Mutação *eq/b* localizada no cromossomo 17 de camundongo causa desenvolvimento cerebelar anormal e ataxia. São Paulo: Tese (Mestre em Ciências) - Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. São Paulo, 116 p., 2007.
- ARIZA, CAROLINA BATISTA. Mutação *eq/b* causa alteração na expressão de genes do controle do ciclo celular de precursores de neurônios cerebelares. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. São Paulo: 202 p., 2011.
- ASSUMÇÃO, A. R. M.; ATHERINO, C. C. T. Conhecendo o funcionamento do labirinto. **Revista HUPE**, Rio de Janeiro; 14(1): 28-30, doi:10.12957/rhupe.2015.14994, 2015.
- BARKER, G.R.I.; WARBURTON, E.C. When Is the Hippocampus Involved in **Recognition Memory**. **J Neurosci** 31:10721–10731 Available at: <http://www.jneurosci.org/content/31/29/10721>, 2011.
- BARNETT, S.A. Behaviour of wild rats in the laboratory. **Medicine and Biology Illustrate**, v. 6, p.104-111, 1956.
- BARNETT, S.A. Exploratory behavior. **British Journal of Psychology**, v. 49, p. 289-310, 1958.

BATATINHA, M. J.; DE SOUZA-SPINOSA, H.; BERNARDI, M. M. Croton zehntneri: possible central nervous system effects of the essential oil in rodents. **J**

Ethnopharmacol, v.45, n.1, Jan, p.53-57, 1995.

BELZUNG, C.; GRIEBEL, G. Measuring normal and pathological anxiety-like behavior in mice: a review. **Behavioral Brain Research**, v.125, p. 141-149, 2001.

BERANECK, M.; LAMBERT, F.M. Impaired perception of gravity leads to altered head direction signals: what can we learn from vestibular-deficient mice? **J**

Neurophysiol, 102: 12–14, 2009.

BERNARDI, M. M.; DE SOUZA, H.; PALERMO NETO, J. Effects of single and long-term haloperidol administration on open field behavior of rats.

Psychopharmacology (Berl), v.73, n.2, p.171-175, 1981.

BESNARD, S.; MACHADO, M.L.; VIGNAUX, G.; BOULOUARD, M.; COQUEREL, A.; BOUET, V.; T. FRERET, P.; DENISE, V. Lelong-Boulouard, Influence of vestibular input on spatial and nonspatial memory and on hippocampal NMDA receptors,

Hippocampus 22 (4) 814–826, 2012.

BESSON, V.; NALESSO, V.; HERPIN, A.; BIZOT, J.; MESSADDEQ, N., ROMAND, R.; PUECH, A.; BLANQUET, V.; HÉRAULT, Y. Training and aging modulate the loss-of-balance phenotype observed in a new ENU-induced allele of Otopetrin1. **Biol Cell**. 97:787–798, 2005.

BODE, V. C. Ethylnitrosourea mutagenesis and the isolation of mutant alleles for specific genes located in the T region of mouse chromosome 17. **Genetics** 108(2): 457-470, 1984.

BOLHIUS, J. J., GIRALDEAU, L. –A. The study of animal behavior. Páginas 1-9 in: **The behavior of animals: Mechanisms, function and evolution** (J. J. Bolhius & L. –A. Giraldeau Eds.). Blackwell, New York, 2005.

BRANDT, T.; SCHAUTZER, F.; HAMILTON, D. A.; BRÜNING, R.; HANS J. MARKOWITSCH, KALLA, R.; DARLINGTON, C.; SMITH, P.; STRUPP, M. Vestibular loss causes hippocampal atrophy and impaired spatial memory in humans. **Brain**; 128 (11): 2732-2741. doi: 10.1093/brain/awh617, 2005.

BRITO, A.S. Manual de ensaios toxicológicos in vivo. Campinas. **UNICAMP**, p. 15-21, 1994.

BROADBENT, N.J.; GASKIN, S.; SQUIRE, L.R.; CLARK, R.E. Object recognition memory and the rodent hippocampus. **Learn Mem** 17:5–11, 2010.

BROADBENT, N.J.; SQUIRE, L.R.; CLARK, R.E. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. **Proc Natl Acad Sci, USA** 101:14515–14520

Available at:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15452348><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC521976>, 2004.

BULT CJ, EPPIG JT, BLAKE JA, KADIN JA, RICHARDSON JE; MOUSE GENOME DATABASE GROUP. The mouse genome database: genotypes, phenotypes, and models of human disease. **Nucleic Acids Research**, 2013.

CAN, A.; DAO, D.T.; TERRILLION, C.E.; PIANTADOSI, S.C.; BHAT, S.; GOULD, T.D. The Tail Suspension Test. **Journal of Visualized Experiments**: 3–7, 2011.

CAN, A.; DAO, D.T.; ARAD, M.; TERRILLION, C.E.; PIANTADOSI, S.C.; GOULD, T.D. The mouse forced swim test. **Journal of Visualized Experiments**: e3638

Available at:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22314943><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3353513>, 2012.

CARNEIRO, JULIANA GARCIA. Mapeamento Genético da Mutação *Sacudidor de Cabeça* em Camundongos. Dissertação (Mestre em Genética) – Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. Belo Horizonte: 56 p., 2006.

CASTAGNÉ, V.; MOSER, P.; ROUX, S.; PORSOLT, R. D. Rodent models of depression: forced swim and tail suspension behavioral despair test in rats and mice. **Porsolt & Partners Pharmacology**, Boulogne- Billancourt, France, 2011.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D.C.; SALGADO, H.R.N. Animais de laboratório: o camundongo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n.1, p.11-23, 2007.

CRAPON DE CAPRONA, M.D.; BEISEL, K.W.; NICHOLS, D.H.; FRITZSCH, B. Partial behavioral compensation is revealed in balance tasked mutant mice lacking otoconia. **Brain Res Bull** 64:289–301, 2004.

CRUZ, J. G. P., DELWING, D., BRUNELLI, A. S., OLIVEIRA, G. C. Efeitos da administração crônica de etanol sobre a aprendizagem no reconhecimento de objetos em camundongos nadadores. **Dynamis revista tecno-científica**, n. 2, vol. 15, p. 26-31, 2009.

CRYAN, J.F.; MOMBÉREAU, C.; VASSOUT, A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. **Neurosci Biobehav Rev** 29:571–625 Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149763405000382>, 2005.

DAVIS A.P., JUSTICE M.J. Mouse alleles: if you've seen one, you haven't seen them all. **Trends Genet. Nov**; 14(11):438-441, 1998.

DEACON, R.M.J.; RAWLINS, J.N.P. T-maze alternation in the rodent. **Nat Protoc** 1:7–12, 2006.

DELLA JUSTINA, HELLEN MATHEI. Variabilidade da atividade cerebral em resposta a estímulos vestibular e oculomotor avaliada por fMRI. São Paulo: Dissertação (Mestre em Ciências) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto. São Paulo, 118p., 2005.

FEATHER-SCHUSSLER, D.N.; FERGUSON, T.S. A Battery of Motor Tests in a Neonatal Mouse Model of Cerebral Palsy. **Journal of Visualized Experiments**. 2016 Nov 3;(117). doi: 10.3791/53569, 2016.

FLAHERTY, J. P.; FAIRFIELD, H. E.; SPRUCE, C.A.; MCCARTY, C.M.; BERGSTROM, D.E. Molecular characterization of an allelic series of mutations in the mouse *Nox3* gene. **Mamm Genome**. April; 22(3-4): 156–169, 2011.

FONCK, C. NASHMI, R. DESHPANDE, P. DAMAJ, M. I. MARKS, M. J. RIEDEL, A. SCHWARZ, J. COLLINS, A. C. LABARCA, C. LESTER, H.A. Increased Sensitivity to Agonist-Induced Seizures, Straub Tail, and Hippocampal Theta Rhythm in Knock-In Mice Carrying Hypersensitive $\alpha 4$ Nicotinic Receptors. **The Journal of Neuroscience**, April 1, p. 2582-2590, 2003.

GUÉNET J.L. Chemical mutagenesis of the mouse genome: an overview. **Genetica**. Sep; 122(1):9-24, 2004.

GONDO Y., FUKUMURA R, MURATA T, MAKINO S. ENU-based gene-driven mutagenesis in the mouse: a next-generation gene-targeting system. **Exp Anim**. p. 537-548, 2010.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology** (1921), v.18, n.3, p.385-403, 1934.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'- motivated behavior. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, 327, 1-5, 1984.

HEFFNER, R. S.; HEFFNER, H. E. Visual factors in sound localization in mammals. **Journal Comp Neurol**, 317, p. 219–232, 1992.

HERDMAN, SUSAN J. Reabilitação vestibular. 2ª edição. São Paulo, Editora Manole, 2002.

HUNGRIA, H. Otorrinolaringologia. 6ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

HURLE B., IGNATOVA E., MASSIRONI S.M., MASHIMO T., RIOS X., THALMANN I., THALMANN R., ORNITZ D.M. Non-syndromic vestibular disorder with otoconial agenesis in *tilted/mergulhador* mice caused by mutations in otopetrin 1. **Human Molecular Genetics**. Apr 1;12(7):777-789, 2003.

HURLE, B.; MARQUES-BONET, T., ANTONACCI, F.; HUGHES, I.; RYAN, J.F.; EICHLER, E.E.; ORNITZ, D.M.; GREEN, E.D. Lineage-specific evolution of the vertebrate Otopetrin gene family revealed by comparative genomic analyses. **BMC Evol Biol**.; 11:23. doi: 10.1186/1471-2148-11-23, 2011.

International Mouse Strain Resource (IMSR) In: <http://www.findmice.org/>. Acesso em: 15 de abril 2017.

JONES, S.M.; ERWAY, L.C.; JOHNSON, K.R.; YU, H.; JONES, T.A. Gravity receptor function in mice with graded otoconial deficiencies. **Hearing research**; 191:34–40, 2004.

JONES, S.M.; JONES, T.A. Genetics of Peripheral Vestibular Dysfunction: Lessons from Mutant Mouse Strains. **Journal of the American Academy of Audiology**; 25(3):289-301. doi:10.3766/jaaa.25.3.8, 2014.

JUSTICE, M. J., NOVEROSKE, J. K.; WEBER, J. S., ZHENG, B., BRADLEY, A. Mouse ENU mutagenesis. **Human Molecular Genetics** 8(10): 1955-1963,1999.

JUSTICE, M. J. Capitalizing on large-scale mouse mutagenesis screens. **Nat Rev Genet** 1(2): 109-115, 2000.

KALUEFF, A. V.; LAPORTE, J.L.; BERGNER, C.L. Neurobiology of grooming behavior. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-80053547934>, 2010.

KAS, M.J.; GLENNON, J.C.; BUITELAAR, J.; EY E, BIEMANS B, CRAWLEY J, RING RH, LAJONCHERE C, ESCLASSAN F, TALPOS J, NOLDUS LP, BURBACH, J.P.; STECKLER, T. Assessing behavioural and cognitive domains of autism spectrum disorders in rodents: current status and future perspectives. **Psychopharmacology**, 231: 1125. doi:10.1007/s00213-013-3268-5, 2014.

KASRI, M.; PICQUET, F.; FALEMPIN, M. Effects of unilateral and bilateral labyrinthectomy on rat postural muscle properties: the soleus, **Exp. Neurol.** 185, 143–153, 2004.

KIM, E.; HYRC, K.L.; SPECK, J.; LUNDBERG, Y.W.; SALLES, F.T.; KACHAR, B.; GOLDBERG, M.P.; WARCHOL, M.E.; ORNITZ, D.M. Regulation of Cellular Calcium in Vestibular Supporting Cells by Otopetrin 1. **Journal of Neurophysiology** ;104 (6):3439-3450. doi:10.1152/jn.00525.2010, 2010.

KIRSTEN, T.B.; CHAVES-KIRSTEN, G.P.; BERNARDES, S.; SCAVONE, C.; SARKIS, J.E.; BERNARDI, 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. McCormick CM, ed. PLoS ONE; 10(7): e0134565. doi: 10.1371/journal.pone.0134565, 2015.

KOMADA, M.; TAKAO, K.; MIYAKAWA, T. Elevated plus maze for mice. **Journal Vis Exp**: 1–4 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2762911&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. 2008.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. In: **Psychopharmacology (Berli)**, v. 92, p. 180-185, 1987.

LOTH, E. A.; ROSSI, A. G. CAPPELLESSO, P. C.; CIENA, A. P. Avaliação da influência do sistema vestibular no equilíbrio de adultos jovens através de posturografia dinâmica foam-laser e plataforma de força. *Semana: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina*, v. 29, n. 1, p. 57-64, 2008.

LUONG, T.N., CARLISLE, H.J., SOUTHWELL, A., PATTERSON, P.H. Assessment of Motor Balance and Coordination in Mice using the Balance Beam. Department of Biology, California Institute of Technology, **JoVE**. 49. In: <http://www.jove.com/details.php?id=2376>, doi: 10.3791/2376, 2011.

MACHADO, M. L.; KROICHVILI, N.; FRERET, T.; PHILOXÈNEA, B.; LELONG-BOULOUARDA, V.; DENISE, P.; BESNARD, S. Spatial and non-spatial performance in mutant mice devoid of otoliths. **Neuroscience Letters** 522, p. 57– 61, 2012.

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. **Braz J Med Biol Res.** Sep;39(9):1217-1226, 2006.

MOORE, K. J. Utilization of mouse models in the discovery of human disease genes. **Drug Discov Today** 4(3): 123-128, 1999.

MORI, C.M.C.; REIS, B.L.F.S.; GODARD, A.L.B.; DAGLI, M.L.Z.; MASSIRONI, S.M.G. Histopathological Description of Skin and Hair Follicle Development in Mutant Careca Mice Induced by Ethyl Nitroso Urea. 57th AALAS National Meeting, Salt Lake City, USA. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, v. 45. p. 130-131, 2006.

- MIYASHIRO S. I., MASSIRONI S. M. G., MORI C. M. C., CRUZ C. C., HAGIWARA M. K., MAIORKA P.C. Characterization of a mouse model for human unstable hemoglobin Santa Ana. **Comparative Medicine**, v. 66, n. 6, p. 437-444, Dec., 2016.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). Guide for the care and use of laboratory animals. 8th ed. Washington D.C: **National Academies Press**, 2011.
- NOVEROSKE, J. K.; WEBER, J. S.; JUSTICE, M. J. The mutagenic action of Nethyl-N-nitrosourea in the mouse. **Mamm Genome** 11(7): 478-483, 2000.
- PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open-closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, 14:149–167, 1985.
- OLIVEIRA, N. S., MANES, M., GARCIA GOMES, M. S. A., BERNARDI, M. M., DE SOUZA, T. A., MASSIRONI, S. M. G., MORI, C. M. C. Caracterização de um Novo Camundongo Mutante como Potencial Modelo para a Síndrome de Kabuki. In: 14º Congresso da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e 3º Encontro Latino Americano de Ciências em Animais de Laboratório, 04 a 06 de maio de 2016, Porto Alegre, RS.
- ORNITZ, D. M.; BOHNE, B. A.; THALMANN, I.; HARDING, G. W.; THALMANN, R. Otoconial agenesis in tilted mutant mice. **Hearing Research** 122, 60-70, 1998.
- OVANDO, PATRÍCIA CAMACHO. Mutação no gene *Nox3* causa fenótipo de falta de coordenação motora e excesso de proliferação de precursores de neurônios cerebelares. Dissertação (Mestre em Ciências) - Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. São Paulo: 60 p., 2014.
- PAFFENHOLZ, R.; BERGSTROM, R. A.; PASUTTO, F.; WABNITZ, P.; MUNROE, R. J.; JAGLA, W.; HEINZMANN, U.; MARQUARDT, A.; BAREISS, A.; LAUFS, J.; RUSS, A.; STUMM, G.; SCHIMENTI, J.C.; BERGSTROM, D. E. Vestibular defects in head-tilt mice result from mutations in *Nox3*, encodingan NADPH oxidase. **GENES & DEVELOPMENT** 18:486–491, 2004.
- PAIGEN, K. A miracle enough: the power of mice. **Nat Med** 1(3): 215-220, 1995.

PETIT-DEMOULIERE, B.; CHENU, F.; BOURIN, M. Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. **Psychopharmacology (Berl)** 177:245–255

Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15609067>, 2005.

POLICARPO, A.C.F.; SILVA, D.A.; MASSIRONI, S.M.G.; GUÉNET, J.L.; GODARD, A.L.B. Molecular characterization of the neuromuscular mutation fraqueza (frqz) induced by ENU in mice. 57º Congresso Brasileiro de Genética, Águas de Lindóia, SP, 2011.

PORSOLT, R.D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266:730–732, 1977.

PORSOLT, R.D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. “Behavioural despair” in rats and mice: strain differences and the effects of imipramine. *Eur J Pharmacol* 51:291–294, 1978.

ROMANINI, C.V.; MACHADO, M.W.; BIAVATTI, M. W.; OLIVEIRA, R. M. W. Avaliação da atividade ansiolítica e antidepressiva do extrato fluido e fração aquosa de folhas de *Passiflora alata* Curtis em camundongos. *Maringá*, v. 28, n. 2, p. 159-164, 2006.

RUSSELL, W. L., KELLY, E. M., HUNSICKER, P. R., BANGHAM, J. W., MADDUX, S. C., PHIPPS, E. L. Specific-locus test shows ethylnitrosourea to be the most potent mutagen in the mouse. **Proc Natl Acad Sci USA** 76(11): 5818-9, 1979.

RUSSELL, N.A.; HORII, A.; SMITH, P.F.; DARLINGTON, C.L.; BILKEY, D.K. Bilateral peripheral vestibular lesions produce long-term changes in spatial learning in the rat, **J. Vestibular Res.** 13, 9– 16, 2003.

SALVAGNI, F. A., PEREIRA, N. B., MORI, C. M. C., MASSIRONI, S. M. G., PINTO, F. A. C. Caracterização do Processo Cicatricial na pele de camundongos mutantes induzidos por Ethylnitrosourea. In: XI CONGRESSO BRASILEIRO EM CIÊNCIAS DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO, São Paulo, SP, 2009. CD-ROM, Resumos, 2009.

SANTOS, B. F. Criação e manejo de camundongos. In: ANDRADE, A., PINTO, SC., OLIVEIRA, RS. **Animais de Laboratório: criação e experimentação [online]**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 388 p. ISBN: 85-7541-015-6. Available from SciELO Books: <http://books.scielo.org>, 2002.

SHEFER, S.; GORDON, C.; AVRAHAM, K. B.; MINTZ M. Progressive vestibular mutation lead to elevated anxiety. **Brain Res** 1317, 157–164, 2010.

SHEFER, S.; GORDON C.; AVRAHAM, K.B.; MINTZ, M. Balance deficit enhances anxiety and balance training decreases anxiety in vestibular mutant mice. **Behav Brain Res** 276:76–83, 2015.

SHIBUYA, T.; E MORIMOTO, K. A review of the genotoxicity of 1-ethyl-1-nitrosourea. **Mutat Res** (1): 3-38, 1993.

TOLLIN D.J.; RUHLAND J.L.; YIN T. C.T. The Vestibulo-Auricular Reflex. **Journal of Neurophysiology**, 101, p.1258-1266, 2009.

TORRES A. A., RZADZINSKA A. K., RIBEIRO A. F., SILVA D. A., GUÉNET J. L., MASSIRONI S. M., GODARD A. L. The circling mutant *Pcdh15*roda is a new mouse model for hearing loss. **Mutation Research**, v. 751-752, p.29-35, doi: 10.1016/j.mrfmmm.2013.09.002, 2013.

TORRES, A.A.; MASSIRONI, S.M.G.; GUÉNET, J.L.; GODARD, A.L.B. Validação do camundongo rodador como modelo para Síndrome de Usher-tipo 1F (USH1F), desordem genética humana caracterizada por deficiência auditiva e retinite pigmentosa. **56º Congresso Brasileiro de Genética**, Guarujá, SP, 2010.

TORTORA, G. J.; DERRICKSON, B. **Corpo Humano Fundamentos de Anatomia e Fisiologia**. 8ª edição, Porto Alegre, Editora Artmed, 2012.

TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacol. Biochem. Behav.**; 44: 463-469, 1993.

WADT, D.; GARCIA GOMES, M. S. A.; MANES, M.; DE SOUZA, T. A.; ALEXANDRE, S. R.; BERNARDI, M. M.; MASSIRONI, S. M. G.; MORI, C. M. C. Estudo de Genes Candidatos do Mutante *cruza pernas* Induzido pelo Agente Mutagênico Químico N-Ethyl-N-Nitrosourea. In: 14º Congresso da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e 3º Encontro Latino Americano de Ciências em Animais de Laboratório, 04 a 06 de maio de 2016, Porto Alegre, RS.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The Open-Field Test: a critical review. **Psychol Bull**, v.83, n.3, May, p.482-504. 1976.

WALTERSTON, R.H., LINDBLAD-TOHL, K., BIRNEY, E. Mouse Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. **Nature**, Dec 5; p. 520-562, 2002.