

UNIVERSIDADE PAULISTA- UNIP

PREJUÍZOS NA INTERAÇÃO SOCIAL DO CAMUNDONGO

MUTANTE EQUILÍBRIO: redução da memória olfatória,

percepção espacial e da área de astrócitos no colículo

superior e aumento na atividade da serotonina no córtex

frontal

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista-UNIP, para obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

BRUNA CRISTINA GARCIA SILVA ORLANDO

São Paulo

2019

UNIVERSIDADE PAULISTA- UNIP

PREJUÍZOS NA INTERAÇÃO SOCIAL DO CAMUNDONGO

MUTANTE EQUILÍBRIO: redução da memória olfatória,

percepção espacial e da área de astrócitos no colículo

superior e aumento na atividade da serotonina no córtex

frontal

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista-UNIP, para obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

Área de concentração: Patologia Ambiental e Experimental

Orientadora: Prof. Dra. Maria Martha Bernardi

BRUNA CRISTINA GARCIA SILVA ORLANDO

São Paulo

2019

Orlando, Bruna Cristina Garcia Silva.

Prejuízos na interação social do camundongo mutante equilíbrio : redução da memória olfatória, percepção espacial e da área de astrócitos no colículo superior e aumento na atividade da serotonina no córtex frontal / Bruna Cristina Garcia Silva Orlando. - 2019.

50 f. : il. + CD-ROM.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, São Paulo, 2019.

Área de concentração: Patologia Ambiental e Experimental.
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Martha Bernardi.

1. Agressividade.
2. Aparelho vestibular.
3. Mutação.
4. Monoaminas.
5. Modelo animal. I. Bernardi, Maria Martha (orientadora). II. Título.

BRUNA CRISTINA GARCIA SILVA ORLANDO

**PREJUÍZOS NA INTERAÇÃO SOCIAL DO CAMUNDONGO MUTANTE
EQUILÍBRIO: redução da memória olfatória, percepção espacial e da área de
astrócitos no colículo superior e aumento na atividade da serotonina no córtex
frontal**

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação
em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade
Paulista-UNIP, para obtenção do título de Mestre em
Patologia Ambiental e Experimental.

APROVADO EM

BANCA EXAMINADORA

Maria Martha Bernardi

Universidade Paulista-UNIP

Thiago Berti Kirsten

Universidade Paulista-UNIP

Claudia Madalena Mori

Universidade de São Paulo-

AGRADECIMENTOS

A Deus, que colocou em meu caminho pessoas tão especiais que me apoiaram e motivaram.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a minha orientadora Prof^a Dr^a Maria Martha Bernardi por ter compartilhado comigo seu conhecimento. Por toda sua contribuição à comunidade científica. Pelo seu apoio, por me ajudar sempre que necessitei. Sendo essa pessoa de grande coração, tão especial que nunca desistiu de nosso projeto.

Agradeço todo o corpo docente e funcionários do Programa de Mestrado em Patologia Ambiental e Experimental, por serem sempre tão prestativos. Em especial a Prof^a Dr^a Maria Anete Lallo que foi tão compreensiva comigo.

Não poderia deixar de agradecer as amizades que fiz nesse período, meu muito obrigada à Ericka Patricia da Silva e Paula da Silva Rodrigues, que me ajudaram durante a execução dos experimentos, pelo apoio e por sempre estarem me motivando a prosseguir e ao Dr. Thiago Moirinho Reis e Silva pelas correções no texto em inglês.

Agradeço também às Professoras Claudia Madalena Mori e Silvia Maria Gomes Massironi pelo fornecimento dos animais e pelas excelentes sugestões neste trabalho. Agradeço ao Prof. Jorge Camilo Florio pela execução das dosagens neuroquímicas.

Em especial, tenho que agradecer a minha mãe Sonia Garcia da Silva e meu irmão Raphael Tadeu, pelo amor incondicional, por compreender minhas ausências. Obrigada, por estarem sempre ao meu lado e acreditarem em meu sonho.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Pró-Reitoria de Pós-graduação da Universidade Paulista – Bolsa de isenção de taxas.

RESUMO

ORLANDO, B.C.G.S. 2018. 49 f. PREJUÍZOS NA INTERAÇÃO SOCIAL DO CAMUNDONGO MUTANTE EQUILÍBRIO: redução da memória olfatória, percepção espacial e da área de astrócitos no colículo superior e aumento na atividade da serotonina no córtex frontal (Dissertação em Patologia Ambiental e Experimental).

O camundongo mutante recessivo denominado equilíbrio (**eqlb**) apresenta deficiência de equilíbrio e incoordenação motora e foi desenvolvido utilizando o agente químico N-ethyl-N-nitrosourea (ENU). O mapeamento genético identificou a mutação no gene NADPH oxidase 3 (Nox3), cromossomo 17, descrito como responsável por defeitos vestibulares e na formação das otocônias. Foi observado que estes camundongos, dentre outros déficits, não apresentavam comportamento agressivo entre machos sugerindo prejuízo de seu comportamento social. O objetivo deste trabalho foi estudar o comportamento social dos camundongos **eqlb** e identificar qual ou quais seriam as causas que levariam à ausência deste tipo de agressividade. Foram avaliados em camundongos **eqlb** e BALB/c: 1) comportamento social e agressivo de machos em colônias estáveis e frente a um intruso; 2) comportamento social/agressivo por isolamento; 3) memória olfatória; 4) percepção espacial. 5) níveis de serotonina e metabólito no córtex frontal; 6) índice por área de astrócitos no colículo superior. Em relação aos camundongos BALB/C, os camundongos **eqlb** mostraram: 1) menor interação social entre os animais em colônias estáveis; 2) maior interação social com o intruso sendo atacados por mais tempo pelo intruso; 3) quando isolados interagiram menos com o intruso e exploraram mais a gaiola; 4) maior latência no teste olfatório; 5) maior imobilidade no teste de suspensão da cauda; 6) maior atividade do sistema serotoninérgico do córtex frontal e 7) redução no índice por área de astrócitos no colículo superior. Conclusões: sugere-se que a menor interação social na colônia estável, a maior interação social com o camundongo estranho bem como a ausência de resposta a agressão do intruso do camundongo **eqlb** possam ser consequência de déficits na memória olfatória, percepção espacial, aumento da atividade serotoninérgica no córtex frontal e redução do índice por área de astrócitos no colículo superior.

Palavras-chave: agressividade, aparelho vestibular; mutação; monoaminas; modelo animal.

ABSTRACT

ORLANDO, B.C.G.S. ORLANDO, B.C.G.S. 2018. 49 f. Impairment of social behavior, reduction of olfactory memory, spatial and index perception by astrocyte area in the superior colliculus, and increased serotonin activity in the frontal cortex of the mutant equilibrium mouse (Dissertation in Environmental and Experimental Pathology)

The recessive mutant mouse, called equilibrium (***eq/b***), presents balance deficiency and motor incoordination and was developed using the chemical agent N-ethyl-N-nitrosourea (ENU). The genetic mapping identified the mutation in the NADPH oxidase 3 (Nox3) gene, chromosome 17, described as responsible for vestibular defects and in the formation of otoconia. It was observed that these mice, among other deficits, did not present aggressive behavior among males suggesting impairment of their social behavior. The objective of this study was to investigate the social behavior of ***eq/b*** mice and to identify which or which would be the causes that would lead to the absence of this type of aggressiveness. ***Eq/b*** and BALB / c mice were evaluated to the: 1) social and aggressive behavior of males in stable colonies and front of an intruder; 2) social / aggressive behavior by isolation; 3) olfactory memory; 4) spatial perception. 5) levels of serotonin and metabolite in the frontal cortex, 6) index by area of astrocytes in the superior colliculus. In relation to the BALB / C mice, the ***eq/b*** mice showed: 1) lower social interaction between animals in stable colonies; 2) greater social interaction with the intruder being attacked for longer by the intruder; 3) when isolated they interacted less with the intruder and explored more the cage; 4) greater latency in the olfactory test; 5) greater immobility in the tail suspension test; 6) higher activity of the serotonergic system of the frontal cortex and 7) reduction in the index by area of astrocytes in the superior colliculus. Conclusions: it is suggested that the lower social interaction in the stable colony, the greater social interaction with the foreign mouse as well as the absence of response to the aggression of the mouse ***eq/b*** to intruder may be a consequence of olfactory memory deficits, spatial perception, increased activity serotonergic in the frontal cortex and reduction of the index by astrocyte area in the superior colliculus.

Key words: aggressiveness, vestibular apparatus; mutation; monoamines; animal model.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Pag.	item
11	Fig.1. Fórmula química do N-ethyl-N-nitrosourea (ENU).
13	Fig.2. Esquema do protocolo de cruzamentos utilizado para o mapeamento de mutação recessiva viável e fértil.
17	Fig. 3. Seleção dos camundongos mutantes <i>eqlb</i> pela observação da postura adotada quando segurados pela cauda; (a) e (b) são camundongos mutantes, (c) é um camundongo BALB/c usado como controle..
26	Fig.4. Comportamento social de camundongos machos em colônias estáveis. A- Frequência de interação social; B- Tempo de interação social; C) Tempo de exploração da gaiola em segundos; D) tempo de limpeza. BALB/c- n=14; <i>eqlb</i> - camundongo equilíbrio, n= 8. Os dados são apresentados como média e erros-padrão das médias. Teste t de Student. ***p=0,002; **** p< 0,0001.
27	Fig.5. Comportamento social de camundongos machos em colônias com um camundongo intruso. A- Tempo interação social com o intruso em segundos; B) tempo de exploração social da gaiola em segundos; C) Tempo de ataque do intruso em segundos; D- Frequência de ataques do intruso. BALB/c- n=14; n=12; <i>eqlb</i> - camundongo equilíbrio. Os dados são apresentados como média e erros-padrão das médias. Fig. A e B- teste t de Student., **** p< 0,0001, *** p = 0,0004. Fig. C e D- teste de Mann-Whitney, *p = 0, 02).
29	Fig.6. Comportamento social de camundongos BALB/c e <i>eqlb</i> submetidos ao isolamento expostos a um intruso. A) Frequência de interação social; B) tempo em segundos de interação social; C) tempo em segundos de exploração da gaiola; D) tempo em segundos de limpeza. Os dados são apresentados como média e erros-padrão das médias. BALB/C- n=14, <i>eqlb</i> - n= 7. Teste t de Student. ****p< 0,0001.
30	Fig.7. Níveis de 5-HT (A) e de 5-HIAA (B) e da razão 5-HIAA/5-HT (C) no cortex frontal de camundongos BALB/c e <i>eqlb</i> . N = 7/grupo. Os

dados são apresentados como média e erros-padrão das médias. Teste **t** de Student. ** p< 0,01 em relação aos camundongos BALB/c.

- 31 Fig.8. Latência (L1, L2, L3 e L4) para coleta de pedaços de biscoitos no teste de memória olfatória de camundongos **eqlb** e BALB/c. Os dados são apresentados como média e erros-padrão das médias. BALB/c- n=14, **eqlb-** n=7. ANOVA de 2 vias seguida pelo teste Sidak de comparações múltiplas. * p< 0,05, ** p< 0,01
- 32 Fig.9. Tempo de imobilidade de camundongos BALB/c (n=14) e **eqlb** (n=7) observados no teste de suspensão da cauda. Os dados são apresentados como média e erros-padrão das médias. Teste **t** de Student. ** p= 0,007. em relação aos animais do grupo BALB/c.
- 33 Fig.10. Índice por área da expressão do GFAP do colículo superior de camundongos **eqlb** e BALB/c. n = 7/grupo. **** p = 0.0006 em relação ao grupo BALB/c. Teste U de Mann Whitney.
-

LISTA DE TABELAS

Pag	Item
28	Tabela 1. Correlações do tempo de exploração e de interação de camundongos BALB/c e eqlb . Teste de correlação de Pearson

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	9
1.1	Camundongo como modelo animal	10
1.2	Mecanismo de ação do ENU como agente mutagênico	11
1.3	Sobre o sistema vestibular	14
1.4	O camundongo equilíbrio (<i>eq/b</i>)	15
1.5	Sobre o comportamento agressivo	17
2.	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivos específicos	20
3.	MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1	<i>Animais</i>	20
3.2	<i>Procedimentos</i>	21
3.2.1	<i>O comportamento social em colônias estáveis</i>	22
3.2.2	<i>O comportamento social em colônias estáveis com um camundongo intruso</i>	22
3.2.3	<i>Comportamento social de camundongos submetidos ao isolamento e expostos a um intruso</i>	22
3.2.4	<i>Avaliação dos níveis de serotonina e metabólitos no córtex frontal</i>	23
3.2.5	<i>Teste para avaliação da função olfatória</i>	23
3.2.6	<i>Teste de suspensão de cauda</i>	24
3.2.7	<i>Imuno-histoquímica do GFAP de astrócitos no colículo superior</i>	24
3.3	Análise estatística	25
4.	RESULTADOS	26
4.1	O comportamento social de camundongos em colônias estáveis	26
4.2	O comportamento social em colônias estáveis com um camundongo intruso	27
4.3	Correlações entre o tempo de exploração e tempo de interação social de camundongos BALB/c e <i>eq/b</i> em colônia estável e com camundongo intruso	28

4.4	Comportamento social de camundongos submetidos ao isolamento expostos a um intruso	28
4.5	Avaliação dos níveis de serotonina e metabólitos no córtex frontal	30
4.6	Teste para avaliação da função olfatória	31
4.7	Teste de suspensão de cauda	32
4.8	Imuno-histoquímica do GFAP de astrócitos no colículo superior	33
5.	DISCUSSÃO	34
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
7.	REFERÊNCIAS	44

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Este trabalho faz parte de um grupo de estudos sobre o fenótipo de camundongos mutantes que envolve as Instituições a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e a Universidade Paulista. Ao todo são 11 linhagens de camundongos mutantes induzidos pelo agente mutagênico ENU e 1 mutante espontâneo (tremor). Neste sentido, muitas mutações recapitulam fenótipos observados em doenças humanas, podendo ser consideradas modelos para a investigação de suas patogenias. O objetivo dos trabalhos do grupo é caracterizar o fenótipo destes mutantes para verificar se estes representariam um modelo útil para estudos de patogenias humanas.

O camundongo mutante recessivo denominado equilíbrio (*eqlb*) apresenta deficiência de equilíbrio e incoordenação motora, e foi gerado por mutagênese utilizando o agente químico N-Ethyl-N-Nitrosourea (ENU) por Massironi et al. (1). O mapeamento genético identificou a mutação no gene NADPH oxidase 3 (Nox3), do cromossomo 17, descrito na literatura como responsável por defeitos vestibulares e na formação das otocônias (2). A caracterização do fenótipo deste camundongo já foi feita previamente por Manes et al (3). Da observação em colônias em biotério notou-se ainda, que além de outros déficits comportamentais, os camundongos machos *eqlb*, não apresentavam comportamento agressivo entre machos como observado em outras linhagens (4). Este fato sugeriu que, possivelmente, estes animais mutantes poderiam apresentar alterações na sua socialização. Desta forma, este trabalho investigou, em modelos de interação social, o comportamento dos camundongos *eqlb* machos na tentativa de verificar se as observações em colônias são devidas a déficits sociais ou não. Para tanto, foram observados o seu comportamento em colônias estáveis e frente a um camundongo intruso e, o efeito do isolamento social, um procedimento que visa aumentar a agressividade, na interação social destes animais. Avaliou-se os níveis de serotonina e seu metabólito bem como da razão metabólito e neurotransmissor no córtex frontal, uma vez que este neurotransmissor nesta área modula o comportamento social (5). Por outro lado, pistas olfativas são importantes no reconhecimento social e assim foi feito um estudo em um modelo de memória

olfatória (6). Levantou-se ainda, a hipótese que os camundongos *eqib* poderiam ter deficiência na percepção espacial. Por este motivo empregou-se um teste para verificar sua resposta gravitacional, o teste de suspensão da cauda. Finalmente, a expressão da proteína fibrilar glial (GFAP) em astrócitos foi observada no colículo superior pois esta área integra as informações visuais, auditivas e somestésicas que modulam o equilíbrio(7).

1.1. Camundongo como modelo animal

Segundo Bult et al (8) o camundongo de laboratório é largamente reconhecido como o modelo animal mais importante na investigação de componentes genéticos e celulares, sendo relevantes para o entendimento de processos fisiológicos e patológicos tanto em seres humanos como também em outras espécies animais. Neste sentido, em 2002 pesquisadores ligados ao projeto “Mouse Genome Sequencing Consortium” publicaram o sequenciamento em alta resolução do genoma do camundongo da linhagem C57BL/6J, demonstrando que cerca de 40% do genoma do camundongo e do humano podem ser diretamente alinhados e que aproximadamente 80% dos genes humanos possuem um gene correspondente no genoma do camundongo. Aproximadamente 99% dos genes do camundongo possuem um gene homólogo no genoma humano e 96% dos genes ortólogos situam-se dentro de um intervalo semelhante e conservado no genoma humano (WATERSTON et al., 2002; GUENET, 2005).

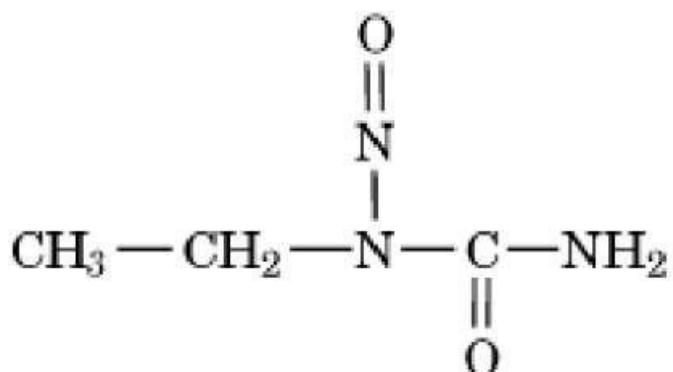
Cerca de quatro mil mutações foram identificadas no genoma do camundongo que expressam uma grande variedade de fenótipos que podem ser espontâneas, induzidas por radiação ou agentes químicos. Tais fenótipos, por exemplo, se expressar como defeitos no esqueleto ou tecido ósseo, alterações na pele ou apêndices, disfunções neuromusculares, doenças hormonais ou metabólicas, defeitos nos olhos, disfunções auditivas, anemias de vários tipos e ‘1’hemoglobinopatias, alterações neurológicas, alterações

comportamentais e neurodegenerativas e efeitos pleiotrópicos*.

1.2. Mecanismo de ação do ENU como agente mutagênico

As mutações espontâneas ocorrem em baixa frequência ($\sim 5 \times 10^{-6}$ por lócus) e por isto, os geneticistas que utilizam camundongos como modelos experimentais, empregam agentes mutagênicos para produzir maior número de novas mutações (11). Dentre os agentes químicos o mais utilizado para induzir mutações em camundongos é o N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) cuja fórmula química $C_3H_7N_3O_2$ está ilustrada pela fig.1.

Fig.1. Fórmula química do N-ethyl-N-nitrosourea (ENU).



Fonte:[<http://what-when-how.com/molecular-biology/ethyl-nitrosourea-molecular-biology/>, acessado em 20 de fevereiro de 2019]

O ENU causa mutações pontuais ao acaso por troca de uma única base nitrogenada pela alquilação direta dos ácidos nucleicos (12). Como muitas das mutações encontradas em doenças genéticas humanas são resultado de mutações pontuais, o agente mutagênico ideal para experimentos de

*The Jackson Laboratory, International Mouse Strain Resource (IMSR) (2017),
 (available at http://www.findmice.org/summary?query=q609g&states=Any&_states=1&types=Any&_types=1&repositories=Any&_repositories=1&_mutations=on

mutagênese fenótipo-dirigido deve gerar mutações pontuais no modelo animal em estudo (13). Assim, o ENU desempenha uma abordagem extremamente poderosa para o entendimento de doenças complexas humanas.

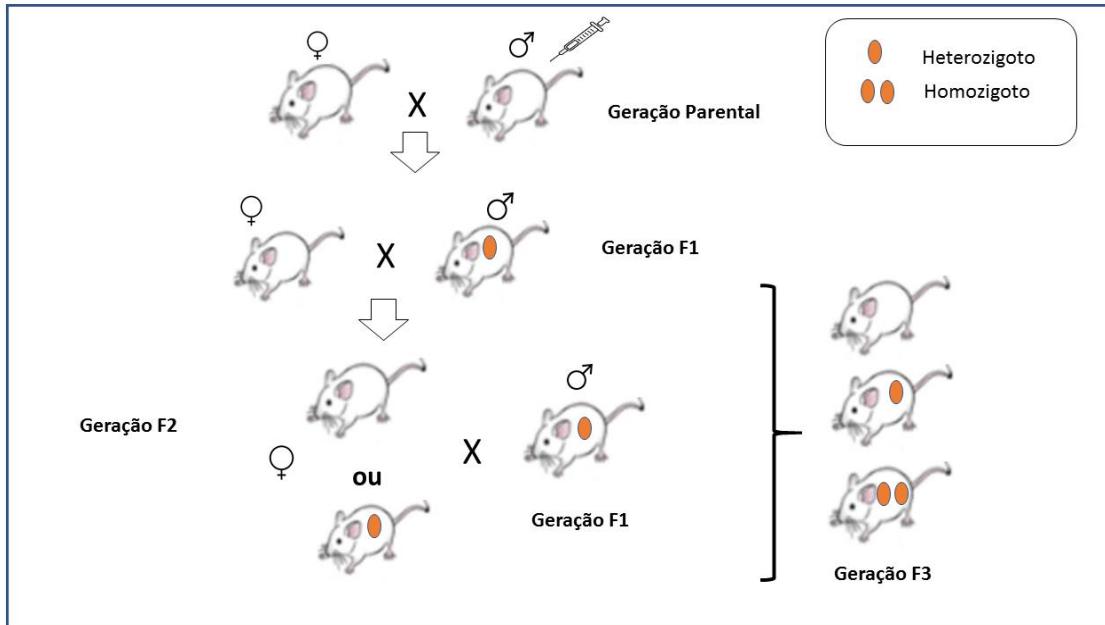
O grupo ethyl do ENU pode ser transferido para radicais oxigênio ou nitrogênio em vários sítios reativos da molécula de DNA (14). O grupo ethyl sozinho não constitui uma mutação, porém sua presença pode causar erro na identidade da base etilada durante a replicação do DNA, que pode resultar em erro no pareamento das bases nitrogenadas, e dessa maneira ocorrer a introdução de mutações pontuais, mas eventualmente podem ocorrer pequenas deleções (SHIBUYA; MORIMOTO, 1993; JUSTICE, 2000).

O protocolo de mutagênese em camundongos que utiliza o ENU, é realizado injetando-se o agente ENU por via intraperitoneal em camundongos machos, para que ocorram mutações nas células primordiais da espermatogônia. Depois do tratamento, esses camundongos passam por um período de esterilidade, sendo que as espermatogônias mutadas repovoam os testículos para produzir clones de espermatozoides mutados (14). Após recuperarem a fertilidade, os machos tratados são cruzados com fêmeas BALB/c não tratadas e os filhotes nascidos são observados para mutações dominantes na geração F1. A seguir são feitos cruzamentos por três gerações para recuperar mutações recessivas. Após estes cruzamentos, a maior parte das mutações recessivas está em homozigose e pode ser observada na geração F3 (Fig.2).

As mutações mais comumente observadas são as transversões AT para TA ou as transições AT para GC e a taxa de mutação observada depende da dose administrada de ENU e da linhagem tratada (14).

Além de ser um agente mutagênico, o ENU é altamente tóxico. Desta forma, os protocolos de tratamento devem permanecer dentro de uma faixa ideal de dose e tempo de exposição, para produzir equilíbrio ótimo entre uma alta frequência de mutação e baixa toxicidade (16). Esta taxa ótima de mutação ocorre em células tronco espermatogoniais na fase pré-meióticas(14).

Fig.2. Esquema do protocolo de cruzamentos utilizado para o mapeamento de mutação recessiva viável e fértil.



Fonte: Orlando, B.C.G.S.

Massironi et al. (1) produziram novas mutações em camundongos utilizando o agente mutagênico químico ENU. Os pesquisadores detectaram 11 novos alelos mutantes, dos quais três mutações são novos alelos no *locus* onde pelo menos outro alelo mutante já havia sido descrito. Entre as outras oito mutações, pelo menos, cinco pareciam ser originais e ocorreram em *loci* onde nenhum alelo mutante já havia sido relatado anteriormente. A primeira mutação mapeada foi o mergulhador identificada no gene Otopetrin 1 ($Otop1^{mlh/mlh}$), localizada no cromossomo 5 em que os camundongos homozigotos apresentam disfunção vestibular caracterizada fenotipicamente pela incapacidade de nadar, posição inclinada da cabeça (*head tilt*), movimentos de agitação quando suspensos pela cauda bem como defeitos na morfogênese das otocônias (17). Outros seis mutantes obtidos nesse projeto (careca, equilíbrio, fraqueza, rodador, sacudidor de cabeça e sem pelo) também já mapeados e a caracterização fenotípica desses modelos tem sido objeto de estudo de diversos autores (18)· (19)· (20) (21)· (22).

1.3. Sobre o sistema vestibular

A região da orelha dos vertebrados - estruturas da orelha média e labirinto – é um dos sistemas anatômicos mais complexos e tem sido no foco de vários estudos ao longo dos séculos. A orelha dos vertebrados combina duas funções principais: equilíbrio e audição (23).

Para manter o equilíbrio corporal estático é necessário um conjunto de estruturas funcionalmente interligada: o sistema vestibular, os olhos e o sistema proprioceptivo. A manutenção do equilíbrio geral é feita pelo sistema vestibular o qual detecta as sensações de equilíbrio. Ele é composto de um sistema de tubos ósseos e câmaras na porção petrosa do osso temporal denominado de labirinto ósseo no qual estão outro sistema de tubos membranosos e câmaras denominado de labirinto membranoso, que é a parte funcional do sistema vestibular ((24)).

O sistema ou aparelho vestibular, conhecido como orgão gravitoceptor, é um conjunto de órgãos do ouvido interno dos vertebrados que detectam os movimentos do corpo e contribui para a manutenção do equilíbrio. Nos seres humanos, é formado pelos três canais semicirculares que na região central se juntam no vestíbulo. O vestíbulo apresenta ainda duas excrescências chamadas sáculo eutrículo. Ao vestíbulo encontra-se igualmente ligado a cóclea que é a sede do sentido da audição. Ao conjunto destas estruturas denomina-se de labirinto, devido à complexidade da sua forma tubular(25). As funções do sistema vestibular são: estabilização da imagem na retina, ajuste postural e orientação gravitacional. Para que isto seja realizado, é necessária a informação sobre a posição e movimento da cabeça, o que é feito pelo labirinto (26). O controle postural está presente em cada movimento realizado, onde contrações musculares apropriadas ocorrem baseadas em informações sensoriais garantindo a posição corporal desejada (27). Estas informações sensoriais, provenientes dos sistemas visuais, vestibulares, auditivos e somatossensoriais auxiliam o Sistema Nervoso Central na realização de ajustes posturais. As cinco principais estruturas vestibulares estão localizadas na orelha interna e incluem: o utrículo, o sáculo e o lateral, canais semicirculares superiores e posteriores. Os órgãos otolíticos (utrículo e sáculo) percebem os movimentos lineares (gravidade) ou aceleração em linha reta enquanto que os canais semicirculares percebem movimentos angulares, a velocidade e não a aceleração (28). Tanto

no utrículo como no sáculo existe uma placa ciliada receptora especializada e tecido conjuntivo formando a mácula. Acima destas máculas estão as otocônias, que são cristais de carbonato, os quais ao se deslocar com o movimento do animal estimulam as células ciliadas da mácula e informam a posição do animal(29). As células ciliadas são semelhantes tanto nas cristas das ampolas dos ductos semicirculares, na mácula utricular e na mácula sacular, sendo todas elas os receptores sensoriais do sistema vestibular(29).

1.4. O camundongo equilíbrio (*eqlb*),

A linhagem de camundongo mutante ***eqlb***, cedida pela Dra. Sílvia Maria Gomes Massironi, é um mutante recessivo que apresenta deficiência de equilíbrio e incoordenação motora sendo oriundo do Biotério de Camundongos do Departamento de Imunologia (ICB-IV/USP). 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 (30).

O gene Nox3 dos camundongos codifica uma oxidase NADPH expressa principalmente na orelha interna. A proteína ligante transmembrana NADPH interage com a proteína 2-trasnmembrana (codificada pela Cyba) e com a proteína do citosol codificada pelo Nox1 forma o NADPH oxidase funcional. Esta enzima é capaz de transportar moléculas de oxigênio através das membranas biológicas formando o superóxido, ocorrendo a seguir a cascata das espécies reativas de oxigênio(31).

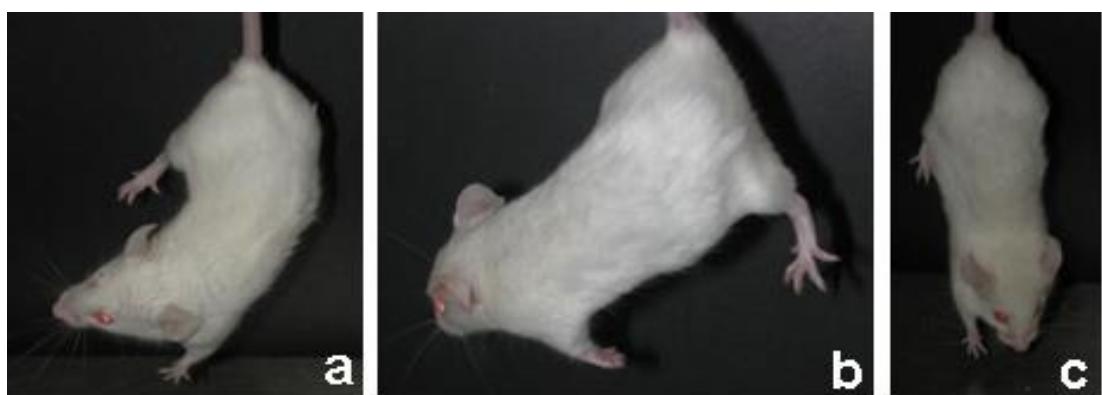
No ***eqlb*** a mutação causadora do fenótipo é uma transversão A>T na posição 190 (sequência transcrita) no gene Nox3, localizado no cromossomo 17 do camundongo com uma consequente substituição de Asparagina (Asp) por Tirosina (Tyr) na posição 64 da proteína. Análises *in silico* mostraram que a substituição de aminoácido leva a alterações nas estruturas primária e secundária da proteína. No camundongo ***eqlb***, Nox3 apresenta apenas uma fita beta, formada pelos aminoácidos nas posições 58-70, ao invés de duas na região

59-61 e 65-70 no BALB/c, além de ter uma Tyr adicional, o que gera um possível novo sitio de fosforilação, segundo predição por análise *in silico* realizada. Além disso, o camundongo ***eqlb*** possui alta expressão de Nox1, indicando uma possível compensação causada pela expressão de Nox3 mutada (32). Nox3 é membro da família das NADPH oxidases, proteínas transmembrana que têm como função a redução do oxigênio molecular para formar espécies reativas de oxigênio (ERO). Detalhes deste gene podem ser visto em: [nox3[gene]] AND (Mus musculus[orgn]) AND alive[prop] NOT newentry[gene].

Esses animais foram inicialmente denominados “tatus” pois mantinham a cabeça enterrada na maravalha e pendiam a cabeça para um dos lados. Mais tarde, observou-se ainda que, ao serem erguidos pela cauda, eles se inclinavam de forma diferente do comportamento esperado de camundongos BALB/c que mantém o seu corpo reto (Fig.3). A partir destas observações levantou-se a hipótese que esses camundongos poderiam apresentar problemas de coordenação motora e possivelmente falta de equilíbrio (30) e foram denominados de equilíbrio (***eqlb***). Os dados da caracterização do fenótipo deste camundongo foram recentemente apresentados em dissertação de mestrado por Manes (2017). Estes mutantes apresentaram redução no sistema sensorial e psicomotor concomitante a redução na frequência de locomoção e levantar observada no campo aberto. Ainda se verificou aumento da imobilidade no teste de suspensão da cauda, redução do comportamento tipo-ansiedade no labirinto em cruz elevada, sem alterações no teste de reconhecimento de objetos e se mostraram incapazes de nadar.

A análise de neurotransmissores em diferentes áreas encefálicas mostrou que a maioria das modificações foram detectadas no hipocampo, área relacionada com as emoções, memória declarativa e espacial (dados não publicados). Estes resultados sugerem que este mutante apresenta comportamentos reduzidos tanto em relação ao estímulo ambiental como em relação ao próprio organismo.

Fig. 3- Seleção dos camundongos mutantes ***eqlb*** pela observação da postura adotada quando segurados pela cauda; (a) e (b) são camundongos mutantes, (c) é um camundongo BALB/c usado como controle. Fonte: ARIZA, (33).



Fonte: ARIZA, (2007)

1.4. SOBRE O COMPORTAMENTO AGRESSIVO

A agressão é um comportamento que envolve uma série de padrões comportamentais, de aspecto multidimensional quanto a sua origem, motivação expressão e funções (34). De uma forma ampla, a agressão pode ser definida como um "comportamento que inflige dano e ferimento ou ameaça fazê-lo" (35) ou "qualquer tipo de comportamento dirigido com objetivo de prejudicar ou ferir outro ser vivo (36). Sob a perspectiva etiológica pode-se definir a agressão ou comportamento agonístico como "adaptações para situações envolvendo conflitos físicos ou concursos entre membros da mesma espécie" (37). Estas adaptações permitem benefícios como a obtenção de alimento, água, parceiros femininos no caso de machos, proteção da prole no caso de fêmeas, defesa do território, sobrevivência e reprodução dos animais. No entanto, dado que o comportamento agressivo comporta riscos associados (custos) de feridos ou mesmo morte, bem como alto dispêndio de energia, o comportamento agressivo é determinado por uma análise custo-benefício (38)-(39). Quando esse equilíbrio é interrompido e um animal mostra um nível exagerado de agressão, o comportamento não é mais adaptativo sendo chamado de agressão desadaptativa ou patológica, objeto de ampla investigação em medicina humana e veterinária (40)-(41)-(42).

O comportamento agressivo ocorre em muitas espécies animais tais como insetos, peixes, lagartos, sapos e na maioria dos mamíferos, incluindo humanos. Este comportamento conservado nos vários níveis da escala

zoológica releva a importância do comportamento agressivo na sobrevivência dos animais e a herdabilidade deste comportamento (42). Os padrões de comportamento agressivo são diferentes entre as espécies, porém existem várias similaridades na neurobiologia da agressão entre roedores, primatas e humanos. A investigação experimental do comportamento agressivo empregando animais de laboratório, em particular os roedores, pode auxiliar a entender a arquitetura neurogenética da agressão em seres humanos bem como em outros animais, embora as conclusões translacionais devam levar em conta o significado ecológico e etológico do comportamento agressivo (agressão típica das espécies) e a violência inadequada (agressão escalonada)(42). É importante lembrar que os circuitos neurais da agressão em roedores já foram elucidados por várias técnicas existindo evidências do envolvimento de vários genes na agressão e diversos circuitos cerebrais implicados na agressão, como o hipotálamo(43), o córtex pré-frontal (44), o núcleo do rafe dorsal (45)(42), o núcleo accumbens (NAc)(46) e o sistema olfatório(47).

Das estratégias existentes que possibilitam o estudo da função de genes de eucariotos, destaca-se a análise de sua disfunção, ou seja, através da produção de mutantes. A mutagênese dirigida é feita por manipular genes já conhecidos em que se utilizam técnicas de engenharia genética (knock-out, sistema Cre-Lox, etc) e as mutações que podem ocorrer espontaneamente ou serem produzidas por mutagênese química que apresenta a vantagem de não precisar de um conhecimento anterior da estrutura do gene (48)(45). Diversas evidências indicam que existe uma multiplicidade de genes envolvidos com a manifestação do comportamento agressivo. Esta complexidade deve ser considerada ao analisar camundongos *knockout*. A deleção de um gene pode ter efeitos diferentes dependendo do plano genético. Por exemplo, camundongos machos e fêmeas com deleção da região de codificação do gene Nr2e1 apresentam comportamento agressivo intenso e são difíceis de manipular (49). Linhagens de camundongos consanguíneos foram amplamente utilizadas para examinar a genética da agressão. Por exemplo, enquanto a linhagem NZB / B1NJ mostra agressão entre machos extremamente alta, a linhagem FVB / NtacfBR mostra agressão em relação às fêmeas(50), enquanto que os camundongos A/J raramente apresentam qualquer comportamento agressivo,

mesmo quando são criados no mesmo ambiente que os camundongos agressivos (51). A seleção genética de algumas linhagens para o estudo da agressão entre machos (52), agressão por isolamento (53)(54) e agressão materna (55) reforçam as características hereditárias da agressão.

Nota-se então que a maioria dos estudos da agressividade em camundongos mutantes preocupa-se com o aumento da agressividade sendo mais raros os que investigam a sua ausência. Sob este ponto de vista, modelos animais com ausência de agressividade podem também contribuir para o entendimento do complexo universo envolvido com a manifestação da agressividade.

Neste sentido, da observação das colônias do biotério notou-se ainda, que além de outros déficits comportamentais, os camundongos machos ***eqlb***, não apresentavam comportamento agressivo, sugerindo estes mutantes poderiam apresentar alterações na sua socialização. Desta forma, este trabalho investigou, em modelos de interação social, o comportamento dos camundongos ***eqlb*** machos na tentativa de verificar se as observações em colônias eram resultado dos déficits sociais ou não.

3. OBJETIVOS

Avaliar o comportamento social do camundongo mutante ***eqlb*** induzido quimicamente pelo agente mutagênico químico ENU.

3.1. Objetivos específicos

Foram avaliados em camundongos machos BALB/c^{*eqlb*} e BALB/c:

- ✓ Comportamento social em colônias estáveis; Comportamento social em colônias estáveis frente a um camundongo intruso; Comportamento social após isolamento frente a um camundongo intruso;
- ✓ Níveis de serotonina e seu metabólito no córtex frontal.
 - ✓ Teste de memória olfatória;
 - ✓ Teste de suspensão da cauda.
 - ✓ Expressão do GFAP de astrócitos no colículo superior

RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os presentes resultados mostraram que em relação aos camundongos BALB/c, os camundongos ***eqlb***: i) apresentaram menor interação social em colônias estáveis e maior exploração da gaiola; ii) na colônia estável em que foi introduzido um intruso, verificou-se maior interação social com o intruso e da exploração da gaiola por parte dos camundongos ***eqlb***, os quais foram atacados por mais tempo pelo intruso; iii) o isolamento social dos camundongos ***eqlb*** promoveu redução da interação social com o intruso, maior exploração da gaiola sem modificações no tempo de limpeza; iv) observou-se déficit na função olfatória e na percepção espacial; vi). houve aumento da atividade da serotonina no córtex frontal; vii) e redução do índice por área de astrócitos no colículo superior.

Propomos que a menor interação social na colônia estável e a maior interação social com o camundongo estranho bem como a ausência de resposta a agressão do intruso do camundongo ***eqlb*** possa ser consequência de déficits na memória olfatória, percepção espacial, aumento da atividade serotoninérgica no córtex frontal e redução do índice por área de astrócitos do colículo superior. A causa destes déficits pode ser consequência da mutação no gene NADPH oxidase 3 (Nox3), cromossomo 17, descrito na literatura como responsável por defeitos vestibulares e na formação das otocônias, porém, são necessários mais estudos para se correlacionar esta mutação com os demais déficits observados no camundongo ***eqlb***.