

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MOTORA E DO APRENDIZADO NO TESTE DO ROTAROD EM CAMUNDONGOS MUTANTES EQUILÍBRIO, MERGULHADOR E RODADOR, QUE APRESENTAM ALTERAÇÕES NO SISTEMA VESTIBULAR

**Beatriz Bosquê Minozzi; Mariana S.A.Garcia Gomes; Silvia Maria Gomes
Massironi; Claudia Madalena Cabrera Mori**

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

biabosque@usp.br

Introdução

O camundongo é amplamente utilizado na pesquisa científica como modelo para estudo de doenças humanas e animais. Por meio do agente químico mutagênico ENU (N-ethyl-N-nitrosourea) foram obtidas 11 mutações, dentre elas os camundongos equilíbrio (Nox3eqlb), mergulhador (Otop1mlh) e rodador (Pcdh15roda), que possuem alterações no sistema vestibular. Dando continuidade ao estudo comportamental destes mutantes, este trabalho fez uso do teste da barra rotatória (Rotarod) para melhor compreensão da influência de tais alterações vestibulares na coordenação motora, no equilíbrio, na resistência à fadiga e na capacidade de aprendizagem e memória ao longo do tempo.

Objetivos

O presente estudo teve como objetivo a análise da função motora e da capacidade de aprendizagem e memória de camundongos mutantes eqlb, mlh e roda em comparação ao seu controle BALB/c por meio do teste do Rotarod, utilizando como parâmetros comportamentais o tempo de latência para a queda e o número de quedas.



Figura 1. Camundongos no teste do Rotarod.

Métodos e Procedimentos

Foram analisadas 40 fêmeas de camundongos, sendo 10 eqlb, 10 mlh, 10 roda e 10 BALB/c (grupo controle) com idade entre 90 e 120 dias. Os animais foram submetidos a 4 dias de treino composto por 3 sessões diárias intercaladas entre si por intervalos de quarenta e cinco minutos, e um dia de teste. No dia do teste, antes do início da primeira sessão, foi realizado o teste de permanência de um minuto ininterrupto. No teste de permanência, a esteira com 3,10 cm de diâmetro, permanecia com velocidade constante de 16 rpm enquanto que nos treinos ela rodava com aceleração progressiva até atingir 20 rpm por 10 minutos (Figura 1). Foi registrado o número de quedas ao longo dos 3 primeiros minutos, sendo que nesse período o camundongo era recolocado na barra. Os animais que caísem após o terceiro minuto eram retirados do teste,

anotando o tempo total de permanência. O estudo foi aprovado pela CEUA/FMVZ-USP sob número de protocolo 4236270521.

Resultados

A análise estatística utilizando o teste ANOVA de duas vias demonstrou que os mutantes eqlb apresentaram maior número de quedas no terceiro dia de treino ($p=0,0104$) e no quinto dia teste ($p=0,0002$) comparados com o grupo controle (Figura 2). O tempo de permanência dos mutantes eqlb também foi menor ($p=0,002$) no dia 5 em relação aos controles (Figura 3). Por outro lado, os mutantes rodapresentaram menor número de quedas no primeiro dia de treino ($p=0,0059$) e maior tempo de permanência ($p=0,0107$) no segundo dia de treino comparados com os controles (Figuras 2 e 3). Os mutantes mlh não apresentaram diferença estatística quando comparados com os controles..

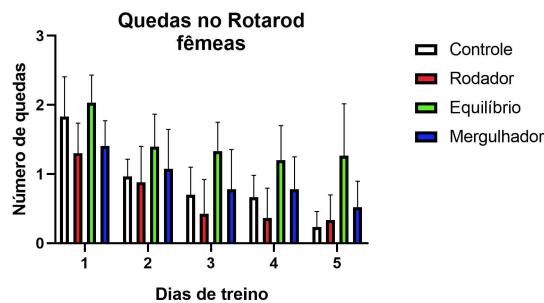


Figura 2: Número de quedas das fêmeas mutantes em relação às controles no Rotarod

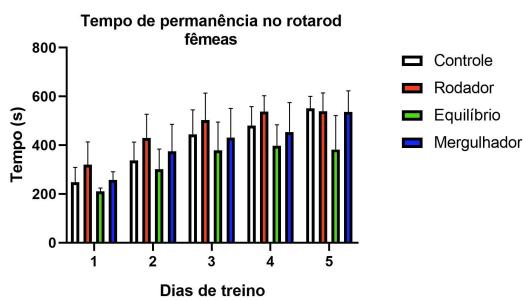


Figura 3: Tempo de permanência das fêmeas mutantes em relação às controles no Rotarod

Conclusão

A partir dos resultados obtidos no teste do Rotarod, pode-se concluir que as fêmeas eqlb apresentaram um pior desempenho em relação à função e aprendizagem motora em relação aos controles. O déficit motor observado nos mutantes eqlb pode estar relacionado com a disfunção do sistema vestibular, assim como com a desorganização na camada de células de Purkinje observada no cerebelo dos mutantes.

Referências Bibliográficas

- ARIZA, CAROLINA BATISTA. Mutação eqlb 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.
- GONDO Y., FUKUMURA R., MURATA T., MAKINO S. ENU-based-driven mutagenesis in the mouse: a next-generations gene-targeting system. *Exp Anim.* p.537-548, 2010.
- 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. *Hum Mol Genet.*, v. 12, n. 7, p. 777-789, 2003.
- JUSTICE, M. J., NOVEROSKE, J. K.; WEBER, J. S., ZHENG, B., BRADLEY, A. Mouse ENU mutagenesis. *Human Molecular Genetics* 8(10): 1955-1963, 1999.
- MANES, M. Caracterização fenotípica e análise do sistema nervoso central dos camundongos mutantes equilíbrio e mergulhador induzidos pelo agente mutagênico N-Ethyl-N-Nitrosourea. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, 2017.
- MANNES, M.; GARCIA-GOMES, M. S. A.; SANDINI, T. M.; ZACCARELLI-MAGALHÃES, J.; FLORIO, J. C.; ALEXANDRE-RIBEIRO, S. R.; WADT, D.; BERNARDI, M. M.; MASSIRONI, S. M. G.; MORI, C. M. C. Behavioral and neurochemical characterization of the mlh mutant mice lacking otoconia. *Behav Brain Res.*, v. 359, p. 958-966, 2019.
- MASSIRONI S. M. G., REIS B. L., CARNEIRO J. G., BARBOSA L. B., ARIZA C. B., SANTOS G. C., GUÉNET J. L., GODARD A. L B. Inducing mutations in the mouse genome with the chemical mutagen ethylnitrosourea. *Brazilian Journal of Medical Biological Research*. v. 39, n. 9, p. 1217-1226, Sep. 2006.
- PAFFENHOLZ, Rainer et al. Vestibular defects in head-tilt mice result from mutations in Nox3, encoding an NADPH oxidase. *Genes & development*, v. 18, n. 5, p. 486-491, 2004.
- TORRES, A. A.; RZADZINSKA, A. K.; RIBEIRO, A. F.; SILVA, D. A.; GUÉNET, J. L.; MASSIRONI, S. M.; GODARD, A. L. The circling mutant Pcdh15roda is a new mouse model for hearing loss. *Mutat Res*, 751-752:29-35, 2013.

EVALUATION OF MOTOR ACTIVITY AND LEARNING IN THE ROTAROD TEST IN *EQUILIBRIO*, *MERGULHADOR*, AND *RODADOR* MUTANT MICE, WHICH PRESENT CHANGES IN THE VESTIBULAR SYSTEM

Beatriz Bosquê Minozzi; Mariana S.A.Garcia Gomes; Silvia Maria Gomes
Massironi; Claudia Madalena Cabrera Mori

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

biabosque@usp.br

Introduction

The mouse is widely used in scientific research as a model for the study of human and animal diseases. Through the chemical mutagenic agent ENU (N-ethyl-N-nitrosourea) 11 mutations were obtained, among them the equilíbrio mice (Nox3eqlb), mergulhador (Otop1mlh) and rodador (Pcdh15roda), which presented alterations in the vestibular system. Continuing the behavioral study of these mutants, this work used the rotating bar test (Rotarod) to better understand the influence of such vestibular impairments on motor coordination, balance, resistance to fatigue and on the capacity for learning and memory throughout the time.

Objectives

The present study aimed to analyze the motor function and learning and memory capacity of mutant mice eqlb, mlh and roda compared to BALB/c control using the Rotarod test, using the latency time for behavioral parameters for the fall and the number of falls.



Figure 1: Mice in the Rotarod test

Material and Methods

Forty female mice were analyzed, 10 eqlb, 10 mlh, 10 roda and 10 BALB/c (control group) aged between 90 and 120 days. The animals were submitted to 4 days of training consisting of 3 daily sessions interspersed with intervals of forty-five minutes, and a test day. On the day of the test, before the start of the first session, the one-minute uninterrupted permanence test was performed. In the permanence test, the treadmill with 3.10 cm in diameter remained at a constant speed of 16 rpm, while in training it ran with progressive acceleration until reaching 20 rpm for 10 minutes (Figure 1). The number of falls over the first 3 minutes was recorded, during which time the mouse was placed back on the bar. Animals that fell after the third minute were removed from the test, recording the total time of stay. The study was approved

by CEUA/FMVZ-USP under protocol number 4236270521.

Results

Statistical analysis using the two-way ANOVA test showed that the eqlb mutants had a higher number of falls on the third day of training ($p=0.0104$) and on the fifth test day ($p=0.0002$) compared to the control group (Figure 2). The permanence time of the eqlb mutants was also shorter ($p=0.002$) on day 5 compared to controls (Figure 3). On the other hand, the roda mutants had fewer falls on the first day of training ($p=0.0059$) and longer permanence time ($p=0.0107$) on the second day of training compared to controls (Figure 2 and 3). The mlh mutants showed no statistical difference when compared to controls.

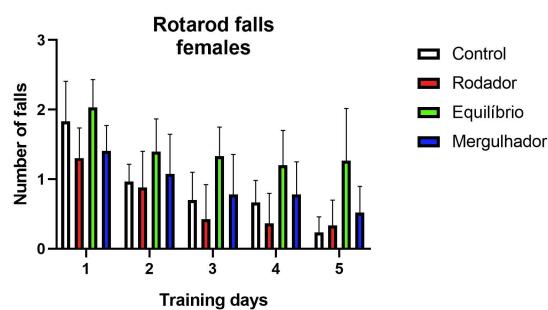


Figure 2: Number of falls of mutant females compared to controls on Rotarod

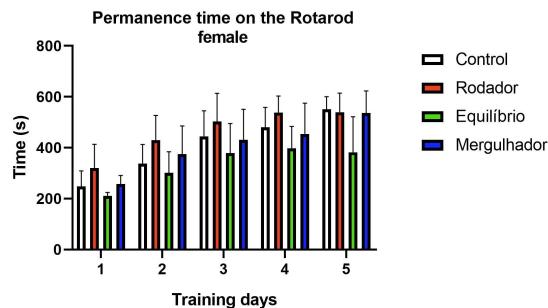


Figure 3: Permanence time of mutant females compared to controls on Rotarod

Conclusions

From the results obtained in the Rotarod test, it can be concluded that eqlb females presented a worse performance in relation to function and motor learning in relation to controls. The motor deficit observed in the eqlb mutants may be related to the dysfunction of the vestibular system, as well as the disorganization in the Purkinje cell layer observed in the cerebellum of the mutants.

Referências Bibliográficas

ARIZA, CAROLINA BATISTA. Mutação eqlb 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.

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

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. *Hum Mol Genet.*, v. 12, n. 7, p. 777-789, 2003.

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

MANES, M. Caracterização fenotípica e análise do sistema nervoso central dos camundongos mutantes equilíbrio e mergulhador induzidos pelo agente mutagênico N-Ethyl-N-Nitrosourea. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, 2017.

MANNES, M.; GARCIA-GOMES, M. S. A.; SANDINI, T. M.; ZACCARELLI-MAGALHÃES, J.; FLORIO, J. C.; ALEXANDRE-RIBEIRO, S. R.; WADT, D.; BERNARDI, M. M.; MASSIRONI, S. M. G.; MORI, C. M. C. Behavioral and neurochemical characterization of the mlh mutant mice lacking otoconia. *Behav Brain Res.*, v. 359, p. 958-966, 2019.

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

PAFFENHOLZ, Rainer et al. Vestibular defects in head-tilt mice result from mutations in Nox3, encoding an NADPH oxidase. *Genes & development.*, v. 18, n. 5, p. 486-491, 2004.

TORRES, A. A.; RZADZINSKA, A. K.; RIBEIRO, A. F.; SILVA, D. A.; GUÉNET, J. L.; MASSIRONI, S. M.; GODARD, A. L. The circling mutant Pcdh15roda is a new mouse model for hearing loss. *Mutat Res.* 751-752:29-35, 2013.