



Laboratório Nacional de Biociências
Centro Nacional de Pesquisas em Energia e Materiais



Projeto para solicitação de bolsa PIBIC-CNPq

**Estudos comportamentais de camundongos portadores de uma nova
mutação da UBE2A**

Pesquisador responsável: Ângela Saito (LNBio, CNPq)

Campinas, abril de 2018

Introdução e Justificativa

Deficiência Intelectual (DI) é uma desordem do neurodesenvolvimento que é caracterizada por significativas limitações na função intelectual e comportamento adaptativo, os quais são aparentes antes dos 18 anos de idade. Sua prevalência é de 2 a 3% na população, com frequência elevada no sexo masculino (de Vries et al., 2005).

DI de herança ligada ao X do tipo Nascimento, também conhecida como síndrome da deficiência da enzima conjugadora de ubiquitina E2 A (UBE2A), foi reportada pela primeira vez em 2006 em 3 homens afetados da mesma família devido a uma mutação nonsense no gene da UBE2A (*UBE2A*) (Nascimento et al., 2006). UBE2A (ou RAD6A) participa do processo de ubiquitinação nas células, juntamente com as enzimas de ativação e ligação a ubiquitina (E1 e E3, respectivamente). UBE2A tem sido relacionada a reparo de DNA, mutagênese induzida, silenciamento gênico, proliferação, degradação de proteínas e transcrição gênica. Desde então, 20 mutações na UBE2A têm sido associadas a DI (8 mutações missense ou nonsense, 2 pequenas inserções ou deleções e 10 grandes deleções) (Haddad et al., 2013; Tsurusaki et al., 2017). Todos os pacientes portadores de mutações no gene da UBE2A são homens e apresentam características clínicas da síndrome que vão de moderada a severa, como características faciais dismórficas, alterações na fala, anomalias genitais e na pele. O modelo de camundongo nocaute para *Ube2a* apresenta déficit cognitivo e infertilidade feminina (Bruinsma et al., 2016; Roest et al., 2004).

Uma nova mutação missense no gene da UBE2A foi recentemente identificada em dois pacientes portadores de DI moderada, cujos aspectos clínicos são: (a) dificuldade de aprendizado/deficiência intelectual moderada e (b) atraso de fonação e aquisição de linguagem, com articulação de palavras bastante comprometida mesmo agora que são adultos. Do ponto de vista físico, apresentam tendão de aquiles encurtado e alguns dismorfismos faciais leves.

Para investigar o impacto desta nova mutação na função da UBE2A, modelos de camundongos portadores da mutação missense no gene UBE2A foram gerados no LNBio-CNPq utilizando a ferramenta de edição do genoma CRISPR/Cas9 e microinjeção pró-nuclear em embrião de camundongos (Wang et al., 2013). Os animais gerados são férteis e serão caracterizados em ensaios de comportamento, morfologia cerebral por tomografia de raio-x e avaliação histológica.

Objetivos

O objetivo deste projeto é avaliar a capacidade de aprendizado, memória, interação social e comportamento repetitivo dos camundongos portadores da nova mutação missense da UBE2A por meio de testes comportamentais, em comparação a indivíduos nativos do mesmo sexo e idade.

Especificamente, iremos realizar os seguintes testes: (1) Teste de interação social em aparato com 3 compartimentos; (2) Teste de reconhecimento de novo objeto; (3) Teste de alternância forçada em Y; (4) Teste de *Marble Burying*.

Metodologia

Os animais que participarão dos testes de comportamento serão submetidos a um período de adaptação, que consiste na manipulação dos camundongos por 5 minutos durante 2 a 5 dias consecutivos antes do início do teste (Page et al., 2009).

O período de adaptação e os testes serão realizados durante o ciclo de luz. No dia do experimento, os animais serão movidos em suas próprias caixas para a sala de testes de comportamento e serão aclimatados durante 45 minutos.

Descrição dos testes de comportamento:

(1) Teste de interação social em aparato com 3 compartimentos: o camundongo a ser avaliado (“teste”) é colocado no compartimento central do aparato e a ele é permitido explorar os 3 compartimentos por 5 minutos. Ao final deste tempo, ele é retirado e é colocado um outro camundongo “estímulo”, previamente aclimatado, em um pequeno recipiente dentro do compartimento lateral esquerdo. O camundongo “teste” é colocado novamente no compartimento central e é mantido em observação durante 10 minutos. O camundongo “estímulo”, mantido no compartimento lateral, se mantém disponível para que o camundongo “teste” possa fazer contato visual, tátil e olfatório. Ao final do período de 10 min, ambos os camundongos são removidos e colocados em suas gaiolas iniciais. O teste todo será gravado para posterior análise dos dados: tempo gasto do camundongo “teste” em cada câmara, número de vezes em que houve contato com o outro camundongo, número de vezes em que se moveu de um compartimento para outro (Page et al., 2009).

(2) Teste de reconhecimento de novo objeto: O camundongo é apresentado a 2 objetos similares em uma caixa quadrada aberta durante uma primeira sessão de 10 min. Após 24 h, um dos objetos é substituído por um novo objeto durante uma segunda sessão e o tempo gasto para o camundongo explorar o novo objeto é marcado. Os camundongos possuem uma tendência espontânea de gastar mais tempo explorando um novo objeto do que um objeto familiar, o que reflete o uso da memória cognitiva e de aprendizado (Leger et al., 2013).

(3) Teste de alternância forçada em Y: O teste ocorre em um aparato em formato de Y, isto é, com 3 braços separados por um ângulo de 120°. Primeiramente, o animal é colocado na ponta de um dos braços e a ele é permitido explorar somente 2 braços (o terceiro está bloqueado) durante 5 minutos. Em seguida, ele é removido e mantido em sua caixa original por 30 minutos. Após esse período, o bloqueio do terceiro braço é removido e o camundongo é colocado novamente na ponta do braço para que ele possa explorar os 3 braços por 5 minutos. O número de vezes em que ele entrou nos braços e em qual braço são medidos para calcular a porcentagem de alternância. Os roedores tipicamente preferem explorar novos ambientes, isto é, o novo braço do que retornar ao braço que já havia visitado previamente (Wolf et al., 2016).

(4) Teste de *Marble Burying*: Bolinhas de vidro do mesmo tamanho são colocadas na superfície da cama de maravalha dos camundongos em 5 colunas de 3 bolinhas. O camundongo é colocado no canto da caixa contendo as bolinhas, tomando cuidado para não o colocar sobre as bolas de vidro, e a caixa é tampada. Água e comida são mantidos na caixa durante o teste. O tempo de duração é de 30 minutos. Ao final do experimento, o camundongo é removido da caixa teste, tomando cuidado para não mover ou deslocar as bolinhas de vidro, e é colocado de volta em sua caixa de origem. O score do teste é obtido à cegas por 3 pessoas diferentes; a bola de vidro é considerada enterrada se dois terços estiver enterrada (Angoa-Pérez et al., 2013)

Referências

- Angoa-Pérez, M., Kane, M. J., Briggs, D. I., Francescutti, D. M., & Kuhn, D. M. (2013). Marble burying and nestlet shredding as tests of repetitive, compulsive-like behaviors in mice. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (82), 50978.
- Bruinsma, C. F., Savelberg, S. M. C., Kool, M. J., Jolfaei, M. A., Van Woerden, G. M., Baarends, W. M., & Elgersma, Y. (2016). An essential role for UBE2A/HR6A in learning and memory and mGLUR-dependent long-term depression. *Human Molecular Genetics*, 25(1), 1–8.
- de Vries, B. B. A., Pfundt, R., Leisink, M., Koolen, D. A., Vissers, L. E. L. M., Janssen, I. M., ... Veltman, J. A. (2005). Diagnostic genome profiling in mental retardation. *American Journal of Human Genetics*, 77(4), 606–16.
- Haddad, D. M., Vilain, S., Vos, M., Esposito, G., Matta, S., Kalscheuer, V. M., ... Verstreken, P. (2013). Mutations in the Intellectual Disability Gene Ube2a Cause Neuronal Dysfunction and Impair Parkin-Dependent Mitophagy. *Molecular Cell*, 50(6), 831–843.
- Leger, M., Quiedeville, A., Bouet, V., Haelewyn, B., Boulouard, M., Schumann-Bard, P., & Freret, T. (2013). Object recognition test in mice. *Nature Protocols*, 8(12), 2531–2537.
- Nascimento, R. M. P., Otto, P. A., de Brouwer, A. P. M., & Vianna-Morgante, A. M. (2006). UBE2A, Which Encodes a Ubiquitin-Conjugating Enzyme, Is Mutated in a Novel X-Linked Mental Retardation Syndrome. *The American Journal of Human Genetics*, 79(3), 549–555.
- Page, D., Kuti, O. J., & Sur, M. (2009). Computerized assessment of social approach behavior in mouse. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 3, 48.
- Roest, H. P., Baarends, W. M., de Wit, J., van Klaveren, J. W., Wassenaar, E., Hoogerbrugge, J. W., ... Grootegoed, J. A. (2004). The Ubiquitin-Conjugating DNA Repair Enzyme HR6A Is a Maternal Factor Essential for Early Embryonic Development in Mice. *Molecular and Cellular Biology*, 24(12), 5485–5495.
- Tsurusaki, Y., Ohashi, I., Enomoto, Y., Naruto, T., Mitsui, J., Aida, N., & Kurosawa, K. (2017). A novel UBE2A mutation causes X-linked intellectual disability type Nascimento. *Human Genome Variation*, 4, 17019.
- Wang, H., Yang, H., Shivalila, C. S., Dawlaty, M. M., Cheng, A. W., Zhang, F., & Jaenisch, R. (2013). One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 153(4), 910–8.
- Wolf, A., Bauer, B., Abner, E. L., Ashkenazy-Frolinger, T., & Hartz, A. M. S. (2016). A Comprehensive Behavioral Test Battery to Assess Learning and Memory in 129S6/Tg2576 Mice. *PLOS ONE*, 11(1), e0147733.