

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Biologia Geral**  
**Programa de Pós-Graduação em Genética**



Dissertação de Mestrado

**Mapeamento Genético e Procura do Gene Candidato  
para a Mutação *Sacudidor de Cabeça* em  
Camundongos**

**Aretta de Andrade Assis Gomes**

**Orientadora: Ana Lúcia Brunialti Godard**

Belo Horizonte  
2012

**ARETTA DE ANDRADE ASSIS GOMES**

**Mapeamento Genético e Procura do Gene Candidato para a  
Mutação *Sacudidor de Cabeça* em Camundongos**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Genética do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientadora: Ana Lúcia Brunialti Godard

Belo Horizonte  
2012

*“Digo: o real não está na saída nem na chegada:  
ele se dispõe para a gente é no meio da travessia...”*

João Guimarães Rosa

## Agradecimentos

Gostaria de expressar os meus mais sinceros e profundos agradecimentos a todos que, de alguma forma, contribuíram para a minha formação e a para a realização deste projeto.

Agradeço a minha orientadora Ana Lúcia Brunialti Godard, por ter me recebido no laboratório de braços abertos, pelas oportunidades a mim concedidas, pelo projeto, pela confiança, paciência, conhecimento compartilhado e pelo convívio.

Aos colegas do LGAH, que me acompanharam nesta jornada acadêmica, em especial aqueles que se tornaram amigos para uma vida inteira:

À minha amiga Adriana, por ter me ajudado em todos os momentos, dentro e fora do laboratório, por estar sempre presente, por sua bondade infinita, pela alegria, pelo companheirismo, pelas conversas, pelas baladas, pelos ensinamentos e por ter se tornado uma pessoa tão importante em minha vida.

À Talitinha pela imensa amizade, pela companhia, simpatia e pelos sorrisos e dilemas compartilhados que tornaram meus dias mais felizes, inclusive os dias quentes em Cuiabá.

À Carol, queridíssima, pelo exemplo de dedicação, força de vontade e garra. Por toda alegria, carinho e pelas infinitas conversas.

Ao querido Bruno, que neste tempo foi muito amigo, me ajudou com sua vasta experiência em seqüenciamentos, pelo carinho, pelas gracinhas e por toda a força dentro e fora do laboratório.

Ao Daniel, que mesmo com toda sua chatice tem seu lugar especial, pela imensa ajuda dentro do laboratório, na teoria e na prática, pelas inúmeras risadas e pelo companheirismo.

À Julia, por ser um presente na minha vida, pela oportunidade de crescer como pessoa, pela delicadeza, pelo imenso carinho e amizade.

À Andrea por ter sido amiga, mãe, irmã e professora, por ter me ajudado nos mais diversos aspectos, com seu vasto conhecimento de tudo e do mundo, pela

convivência enriquecedora, pelas análises de PCR em Tempo Real, pelos cafês e inúmeras reflexões.

Às minhas grandes amigas de infância, Anninha e Bianquinha, que passaram estes anos em outras cidades, mas continuaram presentes em minha vida, agradeço pela amizade verdadeira além da distância, pela certeza do apoio sempre e pela torcida.

Aos meus pais que são responsáveis pela pessoa que sou hoje e por todas as minhas conquistas e meu caráter. Agradeço por investirem nos meus estudos, por acreditarem no meu potencial e nas minhas escolhas, por toda dedicação, confiança e pelo imenso amor.

À minha irmã Andrezza pelo amor sem medida, pela alegria, força, inocência e sinceridade.

À Deus pela vida, pela oportunidade de conhecer pessoas maravilhosas e poder crescer profissionalmente e pessoalmente a cada dia ao lado delas.

A todos vocês, meu sincero agradecimento!

## Sumário

Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tabelas.....	ix
Lista de Abreviaturas.....	x
1. Resumo.....	1
2. Abstract.....	2
3. Introdução.....	3
3.1. Modelos animais.....	3
3.2. Estudo da Função Gênica.....	4
3.3. Geração de Mutantes.....	6
3.4. ENU.....	7
3.5. O Camundongo como Organismo Modelo – Indução de Novas Mutações.....	8
3.6. A mutação Sacudidor de Cabeça.....	9
3.7. Mapeamento Genético.....	12
4. Justificativa.....	15
5. Objetivos.....	16
5.1. Objetivo geral.....	16
5.2. Objetivos específicos.....	16
6. Metodologia.....	17
6.1. Amostras.....	17
6.1.1 Marcadores Genéticos.....	17
6.1.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	18
6.1.3 Análise de polimorfismos – Microsatélites.....	20
6.2. Sequenciamento – SNP.....	21
6.2.1 Desenho dos iniciadores.....	22
6.2.2 Reação de Sequenciamento.....	23
6.2.3 Análise das Sequências.....	24
6.2.4 Construção do Haplótipo.....	24
6.3. PCR em Tempo Real.....	24
6.3.1 Extração de RNA.....	25
6.3.2 Confecção de cDNA: RT-PCR.....	26
6.3.3 Desenho dos iniciadores – qPCR.....	27

6.3.4 Reações .....	27
6.3.5 Normalização dos dados .....	288
6.3.6 Análise Estatística .....	29
6.4. Sequenciamento do gene Rnd1 .....	29
6.4.1 Desenho dos Iniciadores – Rnd1.....	30
6.4.2 Purificação.....	30
6.5. Cultura de Células Granulares do Cerebelo.....	31
7. Resultados .....	32
7.1. Cruzamentos.....	32
7.2. Mapeamento Genético.....	33
7.3. PCR em Tempo Real .....	37
7.4. O gene Rnd1.....	39
7.5. Sequenciamento do gene Rnd1 .....	42
7.6. Cultura de Células Granulares do Cerebelo.....	42
8. Discussão.....	43
9. Conclusão .....	43
10. Referências Bibliográficas .....	49
11. Anexos .....	52
11.1. Anexo 1 .....	52
11.2. Anexo 2.....	53
11.3. Anexo 3.....	54

## Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> SEM do ouvido interno de animais <i>Sacudidor de Cabeça</i> e controles BALB/c .....	10
<b>Figura 2:</b> Retrocruzamento para obtenção dos animais mutantes utilizados no mapeamento genético .....	12
<b>Figura 3 :</b> SNPs entre as linhagens BALB/c e C57BL/6, localizados dentro a região mapeada.....	21
<b>Figura 4:</b> Eletroforese para visualização do polimorfismo entre as linhagens BALB/C e C57BL/6 para o marcador D15Mit159.....	33
<b>Figura 5:</b> Cromatograma com a identificação de heterozigose (G/T) na posição do SNP rs8243603.....	34
<b>Figura 6:</b> Haplótipo resultante do mapeamento genético da mutação <i>Sacudidor de Cabeça</i> .....	34
<b>Figura 7:</b> Regiões de sintenia entre a região mapeada para a mutação <i>Sacudidor de Cabeça</i> e os cromossomos humanos.....	35
<b>Figura 8:</b> Boxplot representativo dos níveis de transcrito para o gene <i>Rnd1</i> entre animais controles e mutantes.....	38
<b>Figura 9:</b> Quantidade relativa de mRNA <i>Rnd1</i> encontrada entre camundongos normais BALB/C neonatos e jovens.....	39
<b>Figura 10:</b> Representação esquemática do gene <i>Rnd1</i> e seus 5 éxons .....	42



## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Onze diferentes fenótipos gerados após tratamento com ENU.....	09
<b>Tabela 2:</b> Marcadores moleculares utilizados no mapeamento genético da mutação <i>Sacudidor de Cabeça</i> .....	18
<b>Tabela 3:</b> Protocolo para reação de PCR.....	19
<b>Tabela 4:</b> Sequência dos iniciadores utilizados para seqüenciamento dos SNPs..	22
<b>Tabela 5:</b> Reação padrão de sequenciamento em ABI 3130.....	23
<b>Tabela 6:</b> Protocolo de reação de RT-PCR.....	26
<b>Tabela 7:</b> Sequência dos iniciadores dos genes de referência utilizados para PCR em Tempo Real.....	27
<b>Tabela 8:</b> Protocolo de PCR em Tempo Real.....	28
<b>Tabela 9:</b> Acompanhamento dos cruzamentos e manutenção da linhagem <i>Sacudidor de Cabeça</i> .....	32
<b>Tabela 10:</b> Genes candidatos à mutação <i>Sacudidor de Cabeça</i> .....	36

## Lista de Abreviaturas

cM – centimorgan

DNA – Ácido desoxirribonucléico

ENU – N-etil-N-nitrosourea

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

Kb – Kilobase

LGAH – Laboratório de Genética Animal e Humana

MGI – Mouse Genome Informatics

pb – par de base

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

RT – Transcriptase Reversa

SEM – Microscopia Eletrônica de Varredura

SNP – Polimorfismo de Nucleotídeo Único

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

USP – Universidade de São Paulo

## 1. Resumo

A mutação *Sacudidor de Cabeça* (*Sacc*) causa uma desordem autossômica dominante no camundongo e foi isolada para estudo durante o projeto desenvolvido em parceria entre o Laboratório de Genética Animal e Humana do ICB/UFMG e o Departamento de Imunologia do ICB/USP, que objetivou a indução de diferentes mutações no genoma de camundongos, utilizando o agente mutagênico N-etil-N-nitrosourea (ENU). Os animais mutantes apresentam um movimento anormal de cabeça e pescoço, para cima e para baixo. Este comportamento é apresentado a partir do oitavo dia de vida e ocorre constantemente, sendo mais acentuado em condições de estresse e desaparecendo durante o sono. No entanto, os animais mutantes são férteis, se desenvolvem normalmente e possuem tempo de sobrevivência normal. Estudos anteriores mapearam a mutação *Sacc* em uma região de 9,3Mb no cromossomo 15, delimitada pelos marcadores microssatélites D15Mit242 e D15Mit77. O presente projeto teve como objetivo a identificação do gene e a caracterização da mutação responsável pelo fenótipo *Sacudidor de Cabeça*.

A análise de ligação utilizando marcadores microssatélites e SNPs permitiu reduzir o intervalo genético que abriga a mutação para 9,1Mb, delimitado pelo marcadores D15Mit242 e rs8243603. A avaliação dos níveis de transcritos dos cinco genes candidatos posicionais *Lrrk2*, *Slc38a*, *Rnd1*, *Cacnb3*, *Kif21a* foi realizada entre os animais controles e mutantes por PCR em Tempo Real. A quantidade de transcrito *Rnd1* apresentou-se aumentada significativamente nos camundongos *Sacudidor de Cabeça*. Deste modo, o gene *Rnd1* foi selecionado como o principal candidato para abrigar a mutação responsável pelo fenótipo e foi isolado para sequenciamento. Até o momento já foram sequenciados 90% da região codificadora e as regiões flangeadoras dos éxons do gene *Rnd1* e nenhuma alteração nucleotídica foi observada. A caracterização da mutação *Sacudidor de Cabeça* permitirá o estudo funcional do gene mutado e contribuirá significativamente para a elucidação dos mecanismos subjacentes ao desenvolvimento do sistema nervoso. O conhecimento obtido a partir deste modelo pode contribuir ainda para o estudo aprofundado e o desenvolvimento de novos tratamentos para desordens neurológicas relacionadas no homem.

## 2. Abstract

The mutation *Sacudidor de Cabeça* (*Sacc*) causes an autosomal dominant disorder in mice and was isolated during a project developed in a partnership between the Laboratory of Animal and Human Genetics - ICB/UFMG and the Department of Immunology - ICB/USP, which aimed to induce different mutations in the genome of mice using the mutagen N-ethyl-N-nitrosourea (ENU). The mutant *Sacc* presents abnormal movement of the head and neck, up and down. This behavior is observed from the eighth day of life and is constant, being more pronounced under conditions of stress and disappearing during sleep. However, the mutant animals are fertile, develop normally and present normal life span. Previous studies have mapped the *Sacc* mutation to a region of 9.3 Mb on chromosome 15, delimited by the microsatellite markers D15Mit242 and D15Mit77. This project aimed at identifying and characterizing the mutation responsible for the phenotype *Sacudidor de Cabeça*.

Linkage analysis using microsatellite markers and SNPs reduced the genetic interval that harbors the mutation to 9.1 Mb, delimited by the marker D15Mit242 and the SNP rs8243603. The assessment of transcript levels of five positional candidate genes *Lrrk2*, *Slc38a*, *Rnd1*, *Cacnb3*, *Kif21a* was performed between control and mutants animals by Real Time PCR. The amount of *Rnd1* transcript was significantly increased in *Sacudidor de Cabeça* mice. Thus, the gene *Rnd1* was selected as a strong candidate for harboring the mutation responsible for the phenotype and was isolated for sequencing. So far, 90% of the coding region and flanking intronic regions of the gene *Rnd1* have been sequenced and no nucleotide alteration has been found. Further characterization of the mutation *Sacudidor de Cabeça* will allow functional studies on the mutated gene and will greatly contribute to understanding the mechanisms underpinning the development of the nervous system. The knowledge obtained from this model may contribute to the understanding and development of new treatments for related neurological human disorders.

## 3. Introdução

### 3.1. Modelos animais

A utilização de modelos animais em pesquisas científicas é essencial para o entendimento do funcionamento dos organismos vivos (Guénet, 2011). A experimentação animal tem contribuído sobremaneira para o desenvolvimento da ciência e tecnologia, promovendo a elucidação de aspectos relacionados ao estudo, tratamento e profilaxia de patologias humanas (Chorilli *et al.*, 2007).

Os modelos animais para doenças genéticas humanas assumem grande importância ao mimetizarem doenças raras cujos estudos com pacientes são difíceis e limitados. Um modelo animal possibilita a realização de observações *in vivo* e a coleta de tecidos, fluidos biológicos e diversos tipos de moléculas. Além disso, os modelos permitem que sejam realizados estudos em todos os estágios do desenvolvimento da doença e do animal (Guénet, 2011).

Do ponto de vista genético, os modelos animais também oferecem vantagens únicas. Eles permitem o estudo dos efeitos de alelos mutantes em *background* genéticos uniformes, permitindo o estabelecimento de associações genéticas e a descoberta de genes modificadores que dificilmente seriam descobertos em humanos. Os modelos transgênicos, desenhados a partir de mutações clonadas em humanos, permitem o estudo das funções biológicas das proteínas associadas a diferentes mutações. Por fim, estes modelos animais contribuem de maneira eficiente para a anotação do genoma ao fornecerem uma ligação entre um gene mutado e um fenótipo anormal (Guénet, 2011).

Os animais utilizados como modelo são escolhidos de acordo com os objetivos da pesquisa a ser realizada. Os modelos animais mais usados para o estudo de doenças humanas são os camundongos, ratos, coelhos, cães, suínos e primatas. Dentre estes, os camundongos são os mais amplamente utilizados e mais conhecidos do ponto de vista científico (Chorilli *et al.*, 2007).

As atuais ferramentas de manipulação genética no camundongo permitem o silenciamento ou expressão de diferentes genes, em todo animal ou em algum tecido específico, a introdução de grandes pedaços de DNA no genoma e até

mesmo engenheirar cromossomos inteiros (Justice *et al.*, 1999). As linhagens isogênicas de camundongos que existem atualmente apresentam um benefício adicional da espécie como organismo modelo devido à possibilidade do uso de diversas ferramentas de manipulação genética para o estudo funcional (Moore, 1999).

A distância evolutiva entre a espécie humana e os camundongos é relativamente curta (em torno de 65/80 milhões de anos), de modo que o camundongo apresenta desenvolvimento, plano corporal, fisiologia, comportamento e doenças muito semelhantes ao homem. Aproximadamente 90% do genoma murino e humano pode ser dividido em regiões de sintonia conservada, refletindo a organização estrutural do cromossomo no ancestral comum e, embora a sequência do camundongo seja aproximadamente 14% menor que a humana, é possível fazer o alinhamento de 40% das sequências das duas espécies (Guénet, 2005).

Do ponto de vista dos genes, cerca de 99% dos genes do camundongo apresentam um homólogo no genoma humano e, para 80% destes, o melhor alinhamento no genoma humano corresponde ao gene ortólogo do camundongo no intervalo conservado de sintonia (Guénet, 2005).

A grande semelhança genética entre as duas espécies e a homologia da quase totalidade dos genes do genoma murino no humano torna o camundongo um bom modelo animal para estudo de disfunções genéticas com enorme aplicabilidade no estudo de doenças humanas. Deste modo, a identificação de muitos genes no camundongo pode ser facilmente transposta para o homem.

### 3.2. Estudo da Função Gênica

Com o sequenciamento do genoma humano e do camundongo, gerou-se uma abundância de dados de sequências anotadas porém com função biológica desconhecida. Neste contexto, a genômica funcional assume importante papel na elucidação dos processos biológicos nos seres vivos. Foram desenvolvidas diferentes metodologias para o estudo da função dos genes visando revelar dados sobre o funcionamento de seus produtos, a quantidade e os locais de expressão.

Uma importante estratégia para o estudo da função gênica é conhecida como “descendente” e consiste, basicamente, na utilização de técnicas de DNA recombinante para promover modificações em sequências codificadoras já identificadas, de maneira a inativar o gene correspondente. A produção de mutações dirigidas é uma abordagem direta para anotação gênica. Deste modo, sequências de DNA de função desconhecida podem ser alteradas *in vitro* e podem ser produzidos embriões com a mutação em homozigose para estudo dos efeitos fenotípicos resultantes da alteração genética (Massironi *et al.*, 2006).

Uma segunda abordagem segue um caminho inverso e é conhecida como “ascendente”, genética inversa ou clonagem posicional. Seu estudo consiste na observação de variações fenotípicas em uma dada população, seguida da identificação molecular do fator genético responsável por clonagem posicional. Por esta estratégia, uma determinada mutação, seja ela espontânea ou induzida, que acarrete no aparecimento de um alelo nulo não-funcional em uma sequência codificadora desconhecida, é selecionada para estudo por meio do fenótipo alterado. Deste modo, a análise de fenótipos mutantes tornou-se uma importante ferramenta para o estudo de função gênica considerando o reflexo da disfunção de determinado gene no fenótipo anormal apresentado pelo modelo (Beckers *et al.*, 2001).

A existência de uma ampla gama de mutações disponíveis para estudos genéticos propiciou, e continua propiciando, enormes avanços no campo de estudo da genética. De fato, a identificação de um alelo não funcional resultante da ocorrência de uma mutação, juntamente com a comparação cuidadosa do fenótipo mutante com o normal, o estudo do defeito molecular gerado por este evento mutacional e da expressão espaço-temporal do gene constituem uma forma excelente de acessar as funções dos genes (Guénet, 2005).

Para que este tipo de estudo seja efetivo, é necessário de que sejam geradas alterações observáveis. Ou seja, é necessário que a alteração genética não comprometa o desenvolvimento embrionário a ponto de impedir que a gestação seja levada a termo, o que inviabilizaria o estudo do fenótipo, e que a alteração genética gere fenótipos evidentes e mensuráveis (Massironi *et al.*, 2006).

A clonagem posicional apresenta a vantagem de ser realizada a partir de um fenótipo conhecido e de interesse biológico ou médico, o qual pode ser detalhadamente estudado em seus aspectos morfológicos, fisiológicos, neurológicos,

comportamentais e de desenvolvimento. Sendo assim, constitui uma estratégia interessante que possibilita que um animal de laboratório portador de uma mutação que resulte em um fenótipo muito semelhante a uma doença humana geneticamente determinada, seja considerado um modelo para seu estudo (Godard, 2008).

### 3.3. Geração de Mutantes

A geração de mutantes que recapitulam doenças humanas vem contribuindo cada vez mais para a compreensão do desenvolvimento de determinada doença (Beckers *et al.*, 2001). Desde os primeiros anos de estudo da genética animal, foram observadas mutações levando a fenótipos anormais ou debilitantes aparecendo espontaneamente nos laboratórios e foram consideradas com uma importante fonte de modelos animais para o estudo de doenças genéticas (Guénet, 2011). As mutações que ocorriam naturalmente em camundongos eram observadas e armazenadas para o estudo do fenótipo. Entretanto, como a ocorrência de mutações espontâneas é relativamente baixa, tornou-se necessário o desenvolvimento de estratégias para a geração de um número maior de fenótipos mutantes (Balling, 2001).

As mutações espontâneas ocorrem no genoma murino com uma frequência de  $\sim 5 \times 10^{-6}$  por *locus*. Os geneticistas iniciaram então a busca por mutágenos eficientes na geração de mutações e a estratégia de raios-x foi uma das primeiras a ser explorada. A frequência de mutagênese por raios-x é de 20 a 100 vezes maior do que mutações espontâneas e causa uma grande variedade de rearranjos cromossômicos como inversões, deleções e translocações. Da mesma forma, o químico Clorambucil causa uma série de rearranjos cromossômicos e com uma maior frequência. Estes agentes mutagênicos, ao causar rearranjos cromossômicos, acabam afetando vários genes (Cordes, 2005), o que inviabiliza a clonagem posicional e o estudo funcional de um único gene.

Novas estratégias de indução de mutações por agentes químicos se mostraram necessárias para a produção sistemática de diferentes mutações que possam ser geradas aleatoriamente em qualquer gene do camundongo.



### 3.4. ENU

Na década de 1970, investigadores da Oak Ridge National Laboratory começaram a explorar o uso de produtos químicos mutagênicos como o N-etil-N-nitrosourea (ENU) para produzir novas mutações no camundongo. Foi constatado que a mutagênese química com ENU introduz mutações com alta eficiência em células tronco espermatogoniais tratadas, a uma frequência de  $150 \times 10^{-5}$  por *locus* (Cordes, 2005).

O ENU é um alquilante que causa, primariamente, mutações pontuais e aleatórias no genoma murino através da transferência direta de um grupo etil do composto para o ácido nucléico. Durante a replicação do DNA, a base nitrogenada alterada acarreta em um mau pareamento da dupla-hélice de DNA, levando a introdução da mutação (Cordes, 2005). Por se constituírem principalmente de substituições de nucleotídeos únicos, as mutações induzidas por ENU são de mais fácil caracterização em nível molecular do que as mutações espontâneas ou induzidas por raios-X ou clorambucil, que em geral são complexas (Guénet, 2011). Esta vantagem, aliada à facilidade de administração, torna o ENU um agente mutagênico especialmente interessante para estudos de clonagem posicional. Diversos trabalhos utilizando o N-etil-N-nitrosourea começaram a ser desenvolvidos com sucesso nos anos que sucederam a descoberta das propriedades deste agente (Cordes, 2005).

Como muitas das mutações encontradas em doenças genéticas humanas são resultado de mutações pontuais, o mutágeno ideal para experimentos de mutagênese fenótipo-dirigido deve gerar mutações pontuais no modelo animal em estudo (Balling, 2001), demonstrando como o ENU desempenha uma abordagem extremamente poderosa para o entendimento de doenças complexas humanas.

O ENU é responsável por promover predominantemente a troca de pares de bases A/T, sendo 44% transversões A/T – T/A, 38% transições A/T – G/C, 8% transições G/C – A/T, 3% transversões G/C – C/G, 5% transições A/T – C/G e 2% transições G/C – T/A. Quando traduzidas, estas alterações resultam em 64% de mutações de sentido trocado, 10% mutações sem sentido e 26% de erros de splicing (Justice *et al.*, 1999).

Além de ser um agente mutagênico, o ENU é altamente tóxico. Por esta razão, os protocolos de tratamento devem permanecer dentro de uma faixa ideal de dose e tempo de exposição, a fim de atingir o equilíbrio ótimo entre uma frequência de mutação elevada e baixa toxicidade (Balling, 2001). A taxa ótima de mutação ocorre em células tronco espermatozoides na fase pré-meioticas (Justice *et al.*, 1999).

O ENU apresenta-se como uma poderosa ferramenta que permite a identificação de novos genes que desempenham um papel importante em processos biológicos e no desenvolvimento de doenças humanas (Ching *et al.*, 2010).

### 3.5. O camundongo como organismo modelo – Indução de novas mutações

O projeto denominado *O camundongo como organismo modelo – Indução de novas mutações*, desenvolvido por uma parceria entre o Laboratório de Genética Animal e Humana (LGAH) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG) e o Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP), foi elaborado visando a indução de diferentes mutações no genoma de camundongos e a seleção de fenótipos de interesse, com o intuito de gerar modelos animais para doenças genéticas humanas e acessar a função gênica (Massironi *et al.*, 2006).

Neste projeto, foi utilizado o agente mutagênico ENU para a produção dos camundongos mutantes. O ENU foi administrado por injeções intraperitoniais em camundongos BALB/c machos. A linhagem BALB/c foi escolhida, uma vez que tolera bem o tratamento e já foi utilizada com sucesso em diversos experimentos de mutagênese (Massironi *et al.*, 2006). Além disso, se trata de uma linhagem fenotipicamente bem caracterizada e para a qual existem milhares de polimorfismos genéticos já descritos, o que facilita enormemente os estudos de ligação.

Camundongos machos BALB/c tratados com ENU foram cruzados com fêmeas da mesma linhagem tão logo se recuperaram do período de infertilidade de até 7 meses provocado pela ação do mutágeno. Os camundongos que apresentaram fenótipo alterado foram observados e caracterizados do ponto de vista fenotípico, levando-se em consideração aspectos morfológicos, histopatológicos e de comportamento (Massironi *et al.*, 2006) e foram selecionados para estudos de

mapeamento genético e clonagem posicional. Neste trabalho foram isolados onze fenótipos mutantes, que estão demonstrados na tabela 1.

**Tabela 1:** Onze diferentes fenótipos gerados após tratamento com ENU.

Mutation	Mode of inheritance	Major phenotype	Chromosome location	Abbreviation
<i>anêmico</i>	Recessive	Anemia	Not yet mapped	<i>anem</i>
<i>bate palmas</i>	Recessive	Clapping with hind limbs when held by tail	Not yet mapped	<i>bapa</i>
<i>careca</i>	Recessive	Fur development	Chr. 7	<i>carc</i>
<i>cruza as pernas</i>	Recessive	Crossing limbs when held by their tail	Not yet mapped	<i>crup</i>
<i>equilibrio</i>	Recessive	Tilted head	Chr. 17	<i>eqlb</i>
<i>fraqueza</i>	Recessive	Progressive loss of motor coordination	Chr. 1	<i>frqz</i>
<i>mergulhador</i>	Recessive	Tilted head	Chr. 5	<i>Otop1<sup>mlh</sup></i>
<i>nervoso</i>	Recessive	Anxiety, abnormally nervous behavior	Not yet mapped	<i>nerv</i>
<i>rodador</i>	Recessive	Circling behavior	Chr. 10	<i>roda</i>
<i>Sacudidor de cabeça</i>	Dominant	Head tossing	Chr. 15	<i>Sacc</i>
<i>sem pelo</i>	Recessive	Fur deficiency	Chr. 11	<i>Foxn<sup>sepe</sup></i>

Massironi *et al.*, 2006

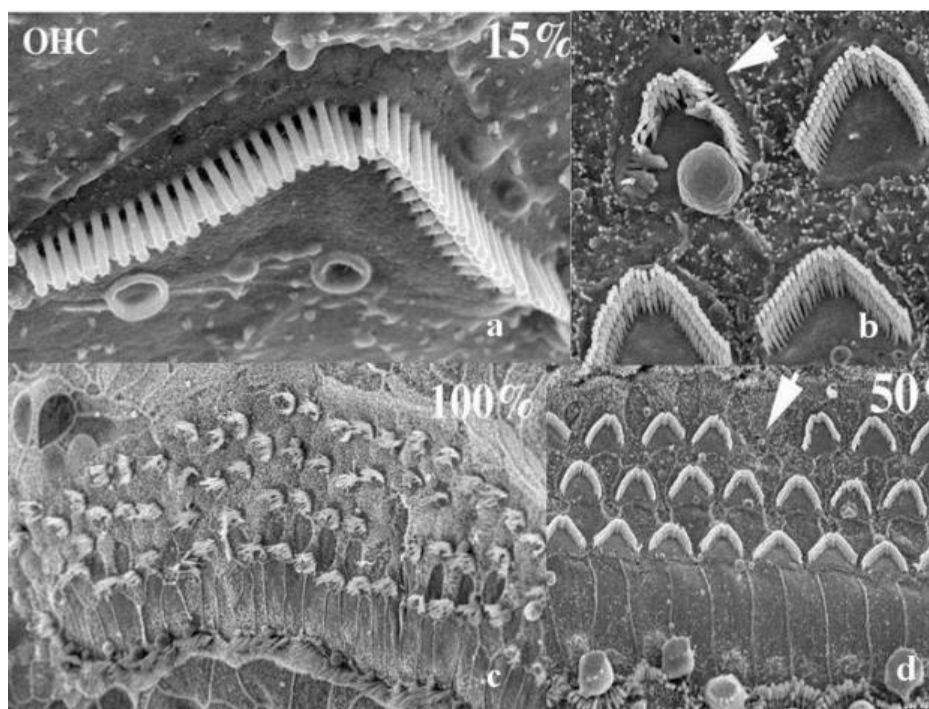
### 3.6. A mutação *Sacudidor de Cabeça*

A mutação *Sacudidor de Cabeça* (“*head shaker*”; symbol - *Sacc*) foi um dos onze diferentes fenótipos gerados pela administração do agente mutagênico ENU e isolados como parte do projeto *O camundongo como organismo modelo – Indução de novas mutações* (Massironi *et al.*, 2006). O isolamento dos mutantes *Sacc* na primeira geração após o tratamento permitiu caracterizar o padrão de herança como autossômico dominante.

Os camundongos afetados pela mutação *Sacudidor de Cabeça* apresentam um movimento anormal de cabeça e pescoço, para cima e para baixo, repetitivamente. Este comportamento é apresentado a partir do oitavo dia de vida e ocorre constantemente, sendo mais acentuado em condições de estresse e desaparecendo apenas durante o sono. No entanto, os animais mutantes são férteis, se desenvolvem normalmente e possuem tempo de sobrevivência normal.

Estudos anteriores realizaram análises histológicas do ouvido interno e cerebelo, microscopia eletrônica de varredura (SEM) da bula auditiva e testes comportamentais com os animais mutantes *Sacc*. As análises histológicas do ouvido interno não demonstraram alterações no formato e no tamanho da cóclea, ou no número e morfologia dos ossículos do ouvido médio dos camundongos mutantes. A análise do cerebelo também não revelou padrão anormal de células. As células de Purkinje e as células granulosas encontram-se presentes e com sua morfologia semelhante à dos animais controle (Carneiro, 2006).

Através da análise de SEM foi observado, nos animais mutantes, uma fileira adicional de outer hair cells na volta apical da cóclea enquanto nos animais controle, foram observadas apenas 3 fileiras. Os animais mutante apresentaram ainda alterações em um pequeno número de estereocílios. Alguns se encontravam degenerados e outros ausentes ao longo da cóclea dos animais mutantes acima de 20 dias de vida (Carneiro, 2006). (Figura 1)



**Figura 1:** SEM do ouvido interno de animais *Sacudidor de Cabeça* e controles BALB/c. 1a: morfologia das OHC na volta basal da cóclea de camundongos controle; 1b: organização das estereocílios em animais *Sacudidor* P30. A seta indica desorganização de uma fileira na volta mediana da cóclea; 1c: fileiras de estereocílios na porção apical da cóclea de animais mutantes P30. Esta figura ilustra

a presença de uma fileira adicional de OHC. Os animais controle possuem apenas 3 fileiras; 1d: volta mediana da cóclea de um Sacudidor P30, onde são observadas ausências de alguns grupamentos de estereocílios (mostrado pela seta). Fonte: Carneiro, 2006.

Os testes comportamentais realizados com os mutantes *Sacc* foram de resposta de alcance, geotaxia negativa, plataforma elevada e teste de natação. Os mutantes não apresentaram alteração de locomoção ou sinal de desequilíbrio e responderam positivamente aos estímulos auditivos indicando ausência de quadro de surdez (Carneiro, 2006).

Já foram descritos na literatura alguns outros distúrbios em camundongos mutantes que levam ao aparecimento de tremores de cabeça e pescoço, porém sempre como alteração fenotípica secundária. A grande maioria destes distúrbios está associada com a perda da audição e com alterações motoras e no equilíbrio do animal. O mutante *flouncer* foi caracterizado em 2004 e apresenta distúrbios de equilíbrio e anormalidades no sistema vestibular e no ouvido interno. O camundongo apresenta movimentos anormais de cabeça e pescoço, gira em torno do próprio eixo e é hiperativo (Pau *et al.*, 2004). O mutante *jolting* apresenta um comportamento agitado, dificuldades de locomoção a partir da 3ª semana de idade e um tremor rítmico de cabeça e pescoço. O fenótipo é causado pela disfunção do gene codificador de canais de sódio *Scn8a*, localizado no cromossomo 15 (Kohrman *et al.*, 1996). O camundongo *Stargazer* surgiu no Jackson Laboratory em 1980. O modelo foi detectado inicialmente por sua marcha instável e incomum, ataxia, repetitivas elevações de cabeça, e quadro epilético moderado. Este mutante apresenta uma mutação recessiva no gene *Cacng2*, subunidade do gene voltage-dependent calcium channel, que reduz severamente sua expressão (Letts, 2005). Estes diferentes modelos contribuíram consideravelmente para o estudo da função dos genes a partir da geração de alelos não funcionais.

O movimento de cabeça e pescoço para cima e para baixo apresentado pelos animais *Sacudidor de Cabeça* é indicativo de alguma disfunção no sistema nervoso. O fenótipo causado pela mutação necessita ser estudado com maior profundidade em seus aspectos morfológicos, fisiológicos, neurológicos, comportamentais e moleculares. Sendo assim, seu detalhamento contribuirá para a observação de

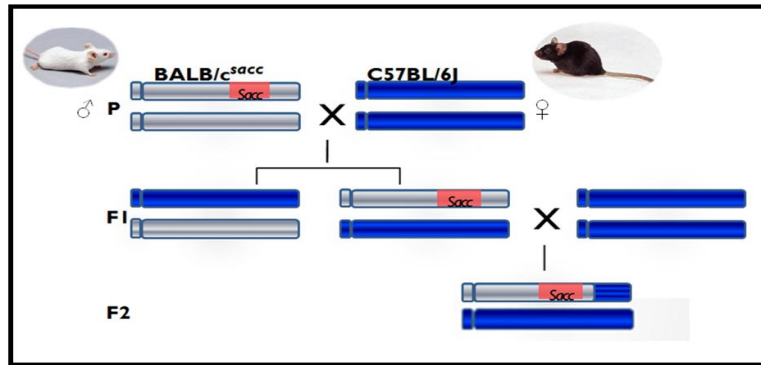
relação do fenótipo com alguma doença neurológica humana geneticamente determinada, sendo possível adquirir informações preciosas e transponíveis ao homem.

### 3.7. Mapeamento Genético

As mutações induzidas por ENU e isoladas a partir dos fenótipos precisam ser mapeadas, localizadas e identificadas para validação do modelo. O mapeamento de genes identificados apenas pelo fenótipo requer o estabelecimento de vários cruzamentos em que o fenótipo em questão segregue com o maior número possível de polimorfismos detectáveis ao nível de DNA (Massironi *et al.*, 2006).

Uma vez que a mutação *Sacc* foi induzida em um *background* BALB/c, foi utilizada a linhagem C57BL/6 para a realização dos cruzamentos destinados ao mapeamento genético. Esta linhagem foi escolhida por ser uma linhagem filogeneticamente distante da BALB/c, o que aumenta a distribuição e a densidade de polimorfismos ao longo do genoma (Massironi *et al.*, 2006).

Camundongos BALB/c<sup>*Sacc*+</sup> machos foram cruzados com fêmeas normais C57BL/6, gerando mutantes híbridos na F1. Por sua vez, F1 foi retrocruzada com o parental normal C57BL/6, dando origem a 171 animais recombinantes (mutantes e normais) utilizados no mapeamento genético (Figura 2).



**Figura 2:** Retrocruzamento para obtenção dos animais mutantes utilizados no mapeamento genético. Foi utilizada a linhagem C57BL/6 a fim de obter um bom grau de polimorfismo e taxa de reprodução adequada para que seja possível observar frequências de recombinação.

O mapa genético é construído através da procura de ligação entre o *locus* mutante e marcadores genéticos vizinhos previamente localizados sobre os cromossomos. Para tanto, primeiramente é identificado o cromossomo que abriga a mutação de interesse e, em seguida, deve-se afinar o mapeamento. Assim, a partir da frequência de recombinação, pode-se inferir se um gene está próximo ou distante a um marcador já conhecido e assim mapear as posições dos genes nos cromossomos. Determinada a região de interesse no cromossomo, o próximo passo é refinar o mapeamento aumentando o número de mutantes testados e selecionando marcadores que recombinem dentro da região delimitada. Desta forma é possível chegar a uma região mínima que abrigue o *locus* mutante (Boyd *et al.*, 1998).

A genotipagem deve ser procedida com ensaios para cada animal afetado com 150 a 160 marcadores distribuídos ao longo dos cromossomos murinos. Para análise de haplótipos, onde assume-se que a recombinação meiótica ocorre poucas vezes por cromossomo, menos marcadores são requeridos, aproximadamente 40 marcadores tem demonstrado ser uma estratégia eficiente. Em alguns casos é possível a utilização de dois grupos para o mapeamento, afetados e não afetados, enriquecendo a construção do haplótipo (Cordes, 2005).

A comparação dos mapas genéticos entre homem e camundongos indica que mais de 90% dos dois genomas podem ser posicionados em regiões conservadas de sintenia, nas quais a ordem dos genes foi conservada em ambas as espécies.

Assim, genes mutados posicionados e identificados no camundongo permitem o estudo da função gênica refletida no fenótipo anormal e, os genes ortólogos nos humanos podem ser identificados, relacionados com o fenótipo e associados a determinadas patologias humanas (Pau *et al.* 2004).

Camundongos BALB/c<sup>Sacc+</sup> machos foram cruzados com fêmeas normais C57BL/6, gerando mutantes híbridos F1. Por sua vez, os camundongos F1 foram retrocruzados com o parental normal C57BL/6, dando origem a 171 animais recombinantes (mutantes e normais) utilizados no mapeamento genético.

O mapeamento genético da mutação *Sacudidor de Cabeça* foi iniciado em estudos anteriores por Carneiro (2006), e a mutação *Sacc* foi mapeada no cromossomo 15 murino.



## 4. Justificativa

O atual conhecimento das sequências completas do genoma humano e do camundongo aumentou ainda mais a importância da genômica funcional, que se encarrega da elucidação dos papéis desempenhados pelos genes. A identificação de correlações entre genes e fenótipos pode fornecer modelos genéticos para doenças humanas e permitir estudos aprofundados dos seus aspectos biológicos.

A mutação *Sacudidor de Cabeça* foi selecionada para mapeamento a partir da observação do fenótipo, caracterizado pelo movimento de cabeça e pescoço para cima e para baixo repetitivamente, sendo indicativo de um distúrbio do sistema nervoso. Com este projeto, espera-se a identificação e caracterização da mutação responsável por tal fenótipo. Deste modo, o estudo aprofundado do camundongo *Sacudidor de Cabeça* em seus aspectos morfológicos, fisiológicos, neurológicos, comportamentais e moleculares proporcionará o estudo funcional do gene mutado e dos mecanismos subjacentes ao desenvolvimento do sistema nervoso. O sistema nervoso é um dos mais complexos do corpo humano, onde podemos encontrar o maior número de genes em funcionamento, porém a função de muitos destes ainda não foi completamente elucidada.

O conhecimento obtido a partir deste modelo contribuirá para a observação de equivalência entre o fenótipo mutante e alguma doença humana geneticamente determinada, sendo possível adquirir informações aplicáveis na medicina humana.

## 5. Objetivos

### 5.1. Objetivo geral

O presente projeto tem como objetivo a identificação do gene e a caracterização da mutação responsável pelo fenótipo *Sacudidor de Cabeça*.

### 5.2. Objetivos específicos

- Reduzir o intervalo genético que abriga a mutação *Sacc* através de novos marcadores moleculares;
- Realizar estudos de análise de expressão gênica para os genes candidatos;
- Isolar e sequenciar um dos gene candidatos;
- Identificar a mutação responsável pelo fenótipo *Sacudidor de Cabeça*;
- Caracterizar fenotipicamente o camundongo *Sacudidor de Cabeça* avaliando a capacidade de equivalência com alguma patologia humana.

## 6. Metodologia

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do ICB/USP em 14 de Setembro de 2000, sob o número de protocolo 29/2000.

### 6.1. Amostras

Inicialmente, os camundongos *Sacudidor de Cabeça* eram mantidos no biotério de experimentação do Departamento de Imunologia do ICB/USP. As amostras de DNA dos 171 animais recombinantes utilizados para o mapeamento genético foram extraídas anteriormente na USP, a partir de amostras de baço e pelo protocolo do fenol-clorofórmio. Para a realização dos demais experimentos, animais mutantes e controles BALB/c foram enviados para o ICB/UFMG por via aérea e processados no LGAH no ICB/UFMG.

Em março/2012, nove animais *Sacudidor de Cabeça* foram trazidos para a UFMG e estão sendo mantidos para acompanhamento e observação detalhada dos cruzamentos e do comportamento dos mutantes. Os animais estão alocados no biotério experimental do departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB/UFMG.

#### 6.1.1 Marcadores Genéticos

O mapeamento genético da mutação *Sacc* foi realizado por análise de ligação, utilizando-se marcadores moleculares polimórficos para as duas linhagens em estudo: BALB/c e C57BL/6.

Os marcadores moleculares utilizados foram 14 do tipo microsatélite e 2 SNPs, selecionados no banco de dados online *Mouse Genome Informatics* (MGI - [www.informatics.jax.org](http://www.informatics.jax.org)). Todos os marcadores escolhidos localizam-se no cromossomo 15. Foram selecionados aqueles marcadores que apresentam maior polimorfismo descrito entre as linhagens em estudo. Os marcadores testados encontram-se listados na tabela 2.

**Tabela 2:** Marcadores moleculares utilizados no mapeamento genético da mutação *Sacudidor de Cabeça*

<b>Marcadores Moleculares</b>	<b>Posição (cM)</b>	<b>Polimorfismo</b>
<b>D15Mit100</b>	19.26	16 pb
<b>D15Mit156</b>	32.19	20 pb
<b>D15Mit68</b>	36.28	8 pb
<b>D15Mit70</b>	38.02	8 pb
<b>D15Mit159</b>	41.96	28 pb
<b>D15Mit242</b>	45.1	14 pb
<b>D15Mit34</b>	45.3	44pb
<b>D15Mit172</b>	46.0	2 pb
<b>D15Mit147</b>	46.8	2 pb
<b>D15Mit161</b>	52.7	24 pb
<b>D15Mit193</b>	53.9	2 pb
<b>D15Mit43</b>	53.9	2 pb
<b>D15Mit44</b>	55.9	2 pb
<b>rs16804833</b>	-	C - T
<b>rs8243603</b>	-	T - G
<b>D15Mit77</b>	56.13	4 pb

Fonte: MGI – (<http://www.informatics.jax.org>)

### 6.1.2 *Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)*

A amplificação dos marcadores moleculares selecionados foi realizada pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), de acordo com o protocolo padrão, com condições de reação demonstradas na tabela 3.

**Tabela 3:** Protocolo para reação de PCR

Reagentes	Volume
<b>H<sub>2</sub>O</b>	18,2 µL
<b>10X DreamTaq Buffer</b>	2,5 µL
<b>dNTP 10 Mm</b>	0,6 µL
<b>Primer F 10 pmol/µL</b>	0,25 µL
<b>Primer R 10 pmol/µL</b>	0,25 µL
<b>DreamTaq Polimerase 5U/µL</b>	0,2 µL
<b>DNA</b>	3,0 µL
<b>Volume Final</b>	25,0 µL

Para amplificação dos fragmentos foi utilizada a enzima DreamTaq Polymerase<sup>TM</sup> Fermentas. O tampão otimizado fornecido pela enzima inclui MgCl<sub>2</sub> na concentração de 20 mM, com concentração final 2mM por reação.

As sequências dos iniciadores utilizadas para amplificação dos marcadores microssatélites foram retiradas do banco de dados online MGI e obtidos da Sigma-Aldrich<sup>TM</sup>. Os primers foram diluídos com água MilliQ na concentração de 10 pmol/µL, com concentração final de 2,5 pmol/µL por reação.

As PCRs foram realizadas com as 171 amostras de DNA e para cada marcador molecular selecionado para a construção do haplótipo. Como controle positivo de amplificação, foram realizadas reações com amostras parentais (BALB/c e C57BL/6) e um “heterozigoto forçado”, composto de uma mistura em proporções idênticas das amostras de BALB/c e C57BL/6, para visualização do perfil heterozigoto.

Todas as reações foram realizadas em termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, CA, USA). Os programas utilizados no termociclador iniciavam-se com 3 minutos (min) de desnaturação a 94°C; seguido por 35 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 95°C, 1 min de anelamento a 55°C – 57°C e 1 min de extensão a 72°C. Uma extensão final por 3 min a 72°C foi realizada ao final de cada reação. A temperatura de anelamento variou entre 55°C e 57°C e foi determinada para cada par de iniciadores, de modo a aumentar a estringência da reação, favorecendo a amplificação dos fragmentos desejados.

### 6.1.3 Análise de polimorfismos – Microssatélites

Os produtos amplificados por PCR foram analisados por eletroforese em gel para a visualização dos polimorfismos. Os fragmentos amplificados apresentavam tamanhos variando entre 90 e 200 pb, e a análise por eletroforese foi realizada em gel de agarose convencional ou agarose Nusieve, de acordo com o tamanho do polimorfismo entre as duas linhagens parentais. Polimorfismos maiores ou iguais a 10 pb foram analisados em gel de agarose (Agargen – agarose padrão) 2 ou 3%, e polimorfismos menores do que 10 pb foram analisados em gel de agarose Nusieve 3:1 (3% agarose Nusieve e 1% agarose convencional). A agarose Nusieve apresenta uma malha mais densa do que a convencional, permitindo assim uma corrida mais lenta e uma maior separação de fragmentos com diferença de tamanho de poucos pares de bases.

Os géis foram aplicados em cubas de eletroforese com tampão TBE 0,5% (Tris 90 mM; Ácido Bórico 90 mM; EDTA 2 mM) e submetidos a uma diferença de potencial de 90V. O tempo de corrida foi estabelecido levando-se em conta a concentração do gel e o polimorfismo do marcador testado, variando de 40 minutos a 4 horas de corrida.

Os géis foram corados com Brometo de Etídio na concentração de 2 µg/mL. Como substituição ao Brometo de Etídio, muitas vezes foi utilizado o corante intercalante Gel Red™ Biotium, por apresentar menor toxicidade e ausência de atividade mutagênica. A visualização dos géis foi feita em fotodocumentador com exposição à radiação ultravioleta.

Em cada gel foi aplicado o ladder de 50pb para determinação do tamanho dos fragmentos amplificados, os controles positivos: amostra BALB/C, C57BL/6 e heterozigoto, e as amostras a serem testadas. O perfil e comparação do tamanho das bandas com os controles positivos permitiu a identificação da amostra como homozigota para o alelo C57BL/6 ou heterozigota, apresentando um alelo de cada parental e indicando ausência de recombinação, na posição do marcador testado.

Os animais homozigotos e heterozigotos foram contados. Uma proporção de animais recombinantes que se distancie da proporção mendeliana evidencia uma ligação do gene mutante com o marcador utilizado.

## 6.2 Sequenciamento – SNP

O DNA de camundongos mutantes e controles BALB/c utilizados no sequenciamento foi extraído a partir de amostras de baço pelo protocolo do fenol/clorofórmio. As amostras foram incubadas em tampão de lise (Tris HCl 10 mM, pH 7.5; NaCl 0,4M; EDTA 0,5 mM, pH 8.0; 0,6% SDS) e proteinase K por 3 horas a 55°C. Ao material incubado foi acrescido fenol saturado na proporção 1:1 e as amostras centrifugadas. Todos os passos de centrifugação foram realizados a 7.000 rpm por 7 minutos a 15°C. Ao sobrenadante foi acrescido fenol:clorofórmio 1:1, e após outro passo de centrifugação, clorofórmio 1:1. O DNA foi precipitado do sobrenadante com etanol 80% gelado, colocado para secar a temperatura ambiente e posteriormente eluído em água milliQ.

A concentração do DNA em cada amostra foi determinada pelo nível de absorbância obtida através da quantificação em espectrofotômetro convencional sob comprimento de onda de 260 nm.

Os dois SNPs entre as linhagens em estudo, encontrados dentro da região previamente delimitada, estão demonstrados na figura 3. Os SNPs foram seqüenciados para identificação dos alelos e análise de ligação, dando continuidade ao mapeamento genético.

SNP ID (dbSNP Build 128)	Map Position (NCBI Build 37)	rs orient	Gene : dbSNP Function Class	Assays (ss)	Variation Type	C57BL/6J	BALB/cJ	Allele Summary (all strains)
rs16804833 <a href="#">MPD</a>   <a href="#">dbSNP</a>   <a href="#">MGI SNP Detail</a>	Chr15:97707026	f	<a href="#">Vdr</a> : Intron	<a href="#">1</a>	SNP	C	T	C/T
rs8243603 <a href="#">MPD</a>   <a href="#">dbSNP</a>   <a href="#">MGI SNP Detail</a>	Chr15:99420608	r	<a href="#">Aqp5</a> : Locus-Region (upstream)	<a href="#">2</a>	SNP	T	G	G/T

**Figura 3:** SNPs entre as linhagens BALB/c e C57BL/6, localizados dentro a região mapeada. Fonte: [www.informatics.jax.org](http://www.informatics.jax.org)

### 6.2.1 Desenho dos iniciadores

As sequências que contêm os SNPs foram retiradas do banco de dados *online* MGI para a confecção dos iniciadores.

Os iniciadores foram desenhados manualmente utilizando-se o programa Primer3 v 0.4.0 (Rozen & Skaletsky, 2000) disponível *on-line*. Os principais parâmetros levados em consideração foram o tamanho dos fragmentos com aproximadamente 300 pb, o tamanho dos iniciadores estabelecido com 20 pb, a temperatura ideal de amplificação a 57°C, além dos valores máximos de auto-complementariedade e auto-complementariedade da extremidade 3', que foram estabelecidos como 5.00 e 2.00, respectivamente.

A qualidade dos iniciadores foi testada utilizando-se o software NetPrimer (Premier Biosoft International - <http://www.premierbiosoft.com/netprimer>). Os iniciadores foram testados individualmente e aos pares quanto à formação de homodímeros, heterodímeros e grampos (*hairpins*), e quanto à presença de sequências repetitivas.

O programa Primer BLAST foi utilizado para a confirmação que os iniciadores escolhidos ampliam uma região única no genoma murino, sendo esta a região de interesse, evitando assim a formação de produto inespecífico que pudesse comprometer a qualidade do seqüenciamento.

Os iniciadores utilizados foram sintetizados pela Sigma-Aldrich™ e estão listados abaixo:

**Tabela 4:** Sequência dos iniciadores utilizados para seqüenciamento dos SNPs

SNP	Iniciador	Sequência (5' – 3')	Tamanho do fragmento
rs16804833	Senso	TTCTTTCTTCACCCACAACCTC	307 pb
	Anti-senso	TGCCCTTCAATGGAGATT	
rs8243603	Senso	CAACCCAGAACTCCATCACTT	353 pb
	Anti-senso	AGGCAGGCGAACTAGATAGAG	



A amplificação das sequências dos SNPs a serem seqüenciados foi realizada por PCR conforme condições descritas no item 6.1.4. A temperatura padrão de amplificação foi estabelecida em 57°C para os dois SNPs.

O produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1%, com diferença de potencial de 90V, por 40 minutos para confirmação da amplificação ótima dos fragmentos de interesse.

### 6.2.2 Reação de Sequenciamento

As reações de sequenciamento foram realizadas em sequenciador ABI, modelo 3130, utilizando o Kit *Big Dye Terminator v.3.01*. As condições de reação envolvem o uso da enzima Big Dye, tampão fornecido pela enzima, iniciadores, água MilliQ e amostra de DNA – produto de PCR, com volume final de 10,0 µL. Os iniciadores utilizados no seqüenciamento foram diluídos para a concentração de 0,8 pmol/µL. As condições da reação estão descrita na tabela 5.

**Tabela 5:** Reação padrão de sequenciamento em ABI 3130

Reagentes	Volume
<b>Big Dye v. 3.01</b>	1 µL
<b>Tampão 10X</b>	1 µL
<b>Primer 0,8 pmol/MI</b>	0,2 µL
<b>Produto PCR</b>	1,5 µL
<b>H<sub>2</sub>O</b>	s.q.p. 10 µL

Todas as reações foram realizadas em termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, CA, USA).

A precipitação da reação de seqüenciamento foi realizada para remoção dos resíduos de iniciadores, reagentes e moléculas fluorescentes não incorporadas. O protocolo utilizado constitui-se na incubação da amostra com EDTA (125 mM), Acetato de Sódio (3M) e Etanol 100% por 15 min a temperatura ambiente e posterior centrifugação a 6.000 rpm por 25 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet

lavado com etanol 70% gelado. Um novo passo de centrifugação foi realizado a 4.500 rpm por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi novamente descartado e a amostra colocada para secar em temperatura ambiente. As amostras foram eluídas em 20 µL de formamida e aplicadas em placas óticas para posterior leitura no sequenciador ABI.

### 6.2.3 *Análise das Sequências*

As sequências obtidas foram alinhadas e analisadas no programa Codon Code Aligner (v.3.7.1, versão demonstrativa). O alinhamento foi realizado utilizando as sequências do banco de dados MGI como referência e analisadas quanto ao polimorfismo no cromatograma.

A identificação do nucleotídeo presente na posição de cada SNP, nas amostras testadas, permitiu observar se esta possuía um alelo C57BL/6, indicando presença de recombinação, ou se era heterozigota C57BL/6 e BALB/c, indicando ausência de recombinação. Os heterozigotos foram identificados pela presença de pico duplo correspondente a um alelo de cada parental na posição de interesse.

Os animais homozigotos e heterozigotos foram contados e informação acrescentada na construção do haplótipo.

### 6.2.4 *Construção do Haplótipo*

A construção do haplótipo foi realizada a partir dos resultados obtidos no mapeamento genético com a utilização de marcadores microssatélites polimórficos e SNPs entre as linhagens parentais, para os 171 animais recombinantes.

## 6.3 *PCR em Tempo Real*

A técnica de PCR em tempo Real foi realizada para avaliar diferenças em níveis de transcrito dos genes candidatos, entre animais mutantes *Sacudidor de Cabeça* e controles BALB/c. A análise foi feita a partir do RNA total extraído do cerebelo de 5 camundongos mutantes e 5 controles em idade adulta (mais de dois

meses de idade). O sexo dos animais não foi padronizado devido a limitação do número de animais mutantes.

Foram realizados novos experimentos de PCR em Tempo Real para avaliar diferenças nos níveis de transcrito para o gene *Rnd1* entre os grupos de camundongos normais BALB/c neonatos (7 a 10 dias) e jovens (40 dias), sexo não padronizado. A análise foi feita a partir do RNA total de cérebro e cerebelo de 5 camundongos em cada grupo.

### 6.3.1 Extração de RNA

Os camundongos *Sacudidor de Cabeça* e os controles foram eutanasiados por decapitação e a dissecação foi realizada em seguida para coleta do cérebro e cerebelo. Os tecidos foram imersos imediatamente no TRizol<sup>®</sup> (Invitrogen) para o procedimento de extração de acordo com o protocolo do fabricante descrito abaixo.

A homogeneização do tecido com TRizol<sup>®</sup> foi feita utilizando-se sonicador (Ultrasonic Processor VCX Modelo CV26, Sonics & Materials, Inc.) por 1 a 3 pulsos de 10 segundos (seg). A solução foi incubada à temperatura ambiente (20-25°C) por 5 min para dissociação do complexo nucleoprotéico. Em seguida, foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio PA. Os tubos foram agitados por inversão, mantidos por mais 2-3 minutos à temperatura ambiente e centrifugados a 12.000 rcf (g) por 15 min a 4° C. Após a centrifugação, aproximadamente 0,6 mL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo e acrescentado 0,5 mL de isopropanol PA 100%. Após mistura por inversão e incubação por mais 10 minutos à temperatura ambiente, foi realizada nova centrifugação a 12.000 rcf por 10 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado cuidadosamente, e ao precipitado foi adicionado 0,8 mL de etanol 75% gelado. Os tubos foram novamente misturados por inversão e centrifugados a 7500 rcf por 5 minutos a 4°C. Ao término da centrifugação o sobrenadante foi desprezado cuidadosamente e o precipitado foi colocado para secar a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram eluídas em 20 µL de água ultra pura<sup>®</sup> (Qiagen, São Paulo, Brasil). As amostras foram homogeneizadas por cerca de 30 minutos e a quantificação de RNA total foi feita utilizando NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc.).

As amostras de RNA de cérebro ficaram degradadas e por isto foram utilizadas apenas as amostras de cerebelo no primeiro experimento de PCR em Tempo Real.

### 6.3.2 Confeção de cDNA: RT-PCR

A confecção do cDNA foi realizada por reação da Transcriptase Reversa. Foi utilizada a enzima RevertAid™ Premium Reverse Transcriptase (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc.), conforme instruções do fabricante descritas a seguir e demonstradas na tabela 6. A reação foi realizada para todas as amostras em um único experimento.

**Tabela 6:** Protocolo de reação de RT-PCR

<b>Reagentes</b>	<b>Volume</b>
<b>RNA 2 µg</b>	12,5 µL
<b>Primer oligo(dT<sub>20</sub>) 100 pmol/µL</b>	1 µL
<b>Mix dNTP 10 mM</b>	1 µL
<b>Tampão 5X RT</b>	4 µL
<b>RiboLock™ RNase Inhibitor 40 U/µL</b>	0,5 µL
<b>Enzima RevertAid™ Premium Reverse Transcriptase 200 U/µL</b>	1 µL

Foram adicionados em tubo eppendorf 2,0 µg de RNA em um volume de 12,5 µL de água MilliQ, iniciadores oligo(dT<sub>20</sub>) (Prodimol Biotecnologia) e mix DNTP (10 Mm), homogeneizados e incubados por 5 min a 65°C. Em seguida, foi dado um choque térmico nas amostras colocando-as em gelo por 5min. Foram adicionados o tampão 5X provido pela enzima, a Ribolock RNase Inhibitor e a enzima RevertAid. As amostras foram homogeneizados e incubados por 30 min a 50°C. A reação foi terminada aquecendo as amostras a 85°C por 5 min. Todas as incubações foram realizadas em temociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, CA, USA). Em todos os ensaios foram utilizados um controle negativo ou NTC, sem adição de RNA.

### 6.3.3 Desenho dos iniciadores – qPCR

Os iniciadores específicos para os genes *Lrrk2*, *Rnd1*, *Cacnb3*, *Slc38a* e *Kif21a* foram desenhados utilizando os softwares previamente descritos para a confecção dos iniciadores para sequenciamento no item 6.1.7. Em cada gene, os iniciadores foram desenhados para o anelamento em dois diferentes éxons, próximos à extremidade 5' do transcrito.

Foram utilizados 3 genes constitutivos ou de referência, escolhidos com base na sua estabilidade e no nível de transcrição que apresentam no sistema nervoso central. São eles: *Gapdh* (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), *B-act* ( $\beta$ -actina) e *Cyclo* ou *Ppia* (Peptidilprolil isomerase A). Para estes genes foram utilizados os iniciadores previamente descritos por Bibancos (2007). (Tabela 7)

**Tabela 7:** Sequência dos iniciadores dos genes de referência utilizados para PCR em Tempo Real

Gene	Iniciador	Sequência (5' – 3')	NM
<i>Gapdh</i>	Senso	AGGAGCGAGACCCCACTAAC	008084.2
	Anti-senso	GTGGTTCACACCCATCACAA	
<i>B-act</i>	Senso	GTGGGAATGGGTCAGAAGG	007393.3
	Anti-senso	GGTCATCTTTTCACGGTTGG	
<i>Cyclo</i>	Senso	AATGCTGGACCAAACACAAA	008907.1
	Anti-senso	CCTTCTTTCACCTTCCCAA	

NM corresponde ao número de acesso da sequência de referência do mRNA no banco de dado online *NCBI*.

### 6.3.4 Reações

As reações de PCR em tempo Real foram realizadas no CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Em todas as reações foi utilizado SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, São Paulo, Brasil), segundo protocolo padrão (Tabela 8). Foi adotado protocolo de corrida sem etapa de

extensão (95° C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95° C por 15 segundos e 60° C por 1 minuto) sendo a captação da fluorescência feita na temperatura de 60°C.

**Tabela 8:** Protocolo de PCR em Tempo Real

Reagente	Volume
SYBR® Green	10 µL
Primer F 10 pmol/µL	0,4 µL
Primer R 10 pmol/µL	0,4 µL
RNA 12,5 ng/µL	1 µL
H <sub>2</sub> O	8,2 µL

A curva de diluição dos primers foi realizada em 5 concentrações seriadas (50 ng/µL, 25 ng/µL, 12,5 ng/µL, 6,25 ng/µL e 3,125 ng/µL) para cada gene analisado e todas as reações foram pipetadas em triplicata. A eficiência das reações foi analisada pelo programa CFX Manager™, versão 2.0 (Bio-Rad Laboratories, Inc.) e foi mantida entre 90 e 100%. Foi estipulado um coeficiente de correlação mínimo de 0,98. Em todas as reações foi feito um controle negativo sem amostra (NTC) com o mesmo volume da reação (20µL). As curvas de dissociação foram analisadas para todos os genes a fim de verificar amplificação de produtos espúrios e/ou dímeros de *primer*. A concentração escolhida para a análise das amostras foi de 12,5 ng de acordo com a melhor eficiência relativa e todas foram aplicadas em triplicata

### 6.3.5 Normalização dos dados

A normalização dos níveis de mRNA foi feita utilizando-se os 3 genes de referência (*Gapdh*, *B-act* e *Cyclo*). Os ciclos limite ou *quantification cycle* (*Cq*) foram colocados em uma planilha do Microsoft Office Excel e a quantidade relativa dos transcritos foi calculada conforme Vandesompele e colaboradores (2002). Segundo esse cálculo, a média aritmética das réplicas é transformada em quantidade relativa da amostra considerando a eficiência da curva de diluição para cada gene. A

amostra com o menor  $C_q$  é considerada como o valor máximo (igual a 1) e é tida como referência para o cálculo das quantidades relativas das demais amostras. As quantidades relativas são normalizadas ao serem divididas pela média geométrica dos 3 genes de referência (fator de normalização).

### 6.3.6 Análise Estatística

As análises foram feitas agrupando-se os dados obtidos para os 5 animais do grupo controle e os 5 animais *Sacudidor de Cabeça*.

A distribuição da normalidade foi avaliada através do teste de *Komolgorov-Smirnov*, e a homocedasticidade da variância pelo teste de *Lilliefors*. A quantidade relativa de mRNA para os genes candidatos foi comparada entre os grupos 'controle' e 'Sacc' pelo teste não-paramétrico *Teste de U de Mann Whitney*. A quantidade relativa de mRNA *Rnd1* entre idades no grupo 'controle' foi comparada pelo *Teste t de Student*. As análises foram realizadas com o programa STATISTICA 6.1 (Stasoft, São Caetano do Sul, Brasil) e o nível de significância mantido foi  $p < 0,05$ .

## 6.4 Sequenciamento do gene *Rnd1*

O sequenciamento permite a identificação de mutações pontuais em um fragmento de DNA. Considerando que a grande maioria das mutações geradas pelo mutágeno ENU já identificadas se encontram em regiões codificantes dos genes ou nas regiões de fronteira entre éxons e íntrons, optou-se pelo sequenciamento destas mesmas regiões para a procura da mutação no gene *Rnd1*. O sequenciamento do gene *Rnd1* foi feito em sequenciador ABI, modelo 3130, utilizando o Kit *Big Dye Terminator v.3.01*, conforme condições descritas no *item 6.1.6*.

#### 6.4.1 Desenho dos Iniciadores – *Rnd1*

A sequência de DNA genômico do gene *Rnd1* (ENSMUSG00000054855) foi retirada do banco de dados *online* Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org/index.html>) para a confecção dos iniciadores.

Os iniciadores foram desenhados para amplificação dos 5 éxons do gene *Rnd1* e suas regiões intrônicas flanqueadoras, utilizando-se dos programas: Primer3 v0.4.0, NetPrimer e Primer Blast, conforme demonstrado no *item 6.1.7*. Os iniciadores utilizados foram sintetizados pela Sigma-Aldrich™ e as sequências estão demonstrados no Anexo 1.

#### 6.4.2 Purificação

A amplificação das sequências do gene *Rnd1* foi realizada por PCR. Foram utilizadas amostras das duas linhagens parentais, BALB/c e C57BL/6, e de dois camundongos *Sacudidor de Cabeça*. As reações de PCR seguiram o mesmo protocolo estabelecido para a amplificação dos marcadores moleculares descritas no *item 6.1.4*. Foi estabelecida a temperatura padrão de 57°C para a amplificação de todos os éxons.

Os produtos amplificados por PCR foram submetidos à eletroforese para verificação da qualidade de amplificação e validação do fragmento de interesse de acordo com o seu tamanho, em gel de agarose (Agargen – agarose padrão) 1%, em TBE (Tris 90 mM; Ácido Bórico 90 mM; EDTA 2 mM), corado com Brometo de Etídio (na concentração 10 mg/mL, 1,0 µL para cada 100,0 mL de gel).

As amostras que apresentaram qualidade satisfatória de amplificação foram purificadas para a eliminação de bandas espúrias e outros resíduos de reagentes. Os produtos de PCR foram purificados com o Kit QIAquick PCR Purification – QIAGEN, conforme o protocolo indicado pelo fabricante, envolvendo o uso de micro centrífuga.



## 6.5 Cultura de Células Granulares do Cerebelo

Para a cultura de células granulares do cerebelo foram utilizados 3 animais normais e 3 *Sacudidor de Cabeça* com 7 dias pós-natal. Os animais foram eutanasiados por decapitação e dissecados para retirada do córtex cerebelar. O tecido foi cortado em pequenos pedaços e lavados e incubados em solução de digestão com 2,5mg/ml de Tripsina tipo III (Sigma Chemical Co., EUA). Em seguida o tecido foi lavado e transferido para a solução de dissociação para o desbaste. As células foram plaqueadas em lamínulas 24 x 24 mm previamente preparadas com Poli-L-lisina (50 µg/ml – Sigma, EUA) e meio DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium – D1152, Sigma Chemical, EUA), suplementado com soro fetal bovino (10%), penicilina e estreptomicina (1%) e potássio (25 mM). As placas foram incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

As células serão fixadas com metanol a 4°C e então coradas com comassie blue. As lamínulas fixadas e coradas serão fotografadas na objetiva de 40x de um microscópio Nikon eclipse TS100 com uma máquina Moticam 2500 (Motic China Group Co, LTD). As fotografias serão analisadas com o software Motic Image Plus 2.0 (Motic China Group Co, LTD). A diferenciação morfológica será estimada pela relação entre as áreas ocupadas por neuritos e corpos celulares e comparada entre grupo controle e mutante.

## 7. Resultados

### 7.1. Cruzamentos

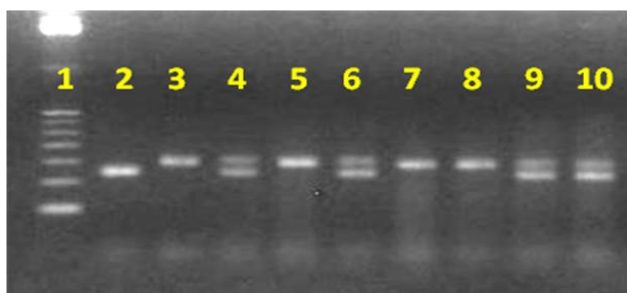
**Tabela 9:** Acompanhamento dos cruzamentos e manutenção da linhagem *Sacudidor de Cabeça*.

GAIOLA 1		
Animais	1 Macho BALB/c	1 Fêmea <i>Sacc</i>
Nascimento	24/01/2012	24/01/2012
<b>Ninhada:</b>		
23/04/2012	3 filhotes normais – apenas 1 sobreviveu	
20/06/2012	3 filhotes normais	
GAIOLA 2		
Animais	2 Fêmeas BALB/c	1 Macho <i>Sacc</i>
Nascimento	28/12/2011	28/12/2011
<b>Ninhada:</b>		
20/03/2012	1 filhote morto encontrado na gaiola	
<b>Observações:</b>		
Macho matou uma das fêmeas e tem o hábito de arrancar o pêlo da sua região oronasal e das fêmeas.		
GAIOLA 3		
Animais	0 Macho	4 Fêmeas <i>Sacc</i>
Nascimento		24/01/2012
<b>Observações:</b>		
Aguardando para serem utilizadas nos experimentos.		
GAIOLA 4		
Animais	1 Macho <i>Sacc</i>	2 Fêmeas <i>Sacc</i>
Nascimento	10/07/2011	17/08/11
<b>Ninhada:</b>		
15/04/2012	1 filhote morto encontrado na gaiola	
23/05/2012	1 filhote morto encontrado na gaiola	
01/06/2012	1 filhote normal	

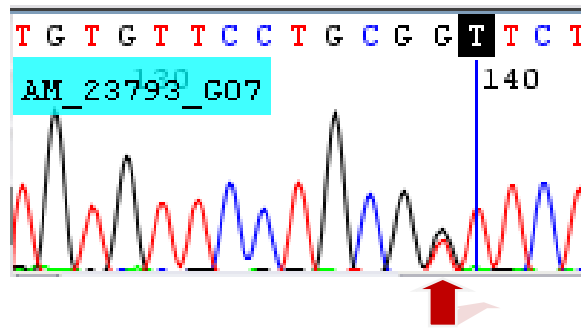
## 7.2. Mapeamento Genético

A análise de ligação constou da genotipagem de 171 animais recombinantes, sendo 146 *Sacudidor de Cabeça* e 25 normais. Os resultados não foram informativos para os marcadores D15Mit34, D15Mit172, D15Mit161, D15Mit44 e o SNP rs16804833, uma vez que os polimorfismos descritos nos bancos de dados não foram observados entre as linhagens em estudo. Não houve amplificação satisfatória dos marcadores D15Mit147 e D15Mit193.

Os demais marcadores testados (D15Mit100, D15Mit156, D15Mit68, D15Mit70, D15Mit159, D15Mit242, D15Mit77 e o SNP rs8243603) forneceram informações utilizadas na análise de ligação e construção do haplótipo (Figuras 4 e 5).



**Figura 4:** Eletroforese para visualização do polimorfismo entre as linhagens BALB/c e C57BL/6 para o marcador D15Mit159. Na canaleta 1 está o ladder de 50 pb. A 2ª canaleta contém o controle BALB/c, com fragmento de 118pb. A 3ª canaleta, o controle C57BL/6, com fragmento de 146pb. Na 4ª canaleta está o controle heterozigoto. Nas canaletas 5-10 estão as amostras testadas. Gel de agarose 2%, corado com Brometo de Etídeo.



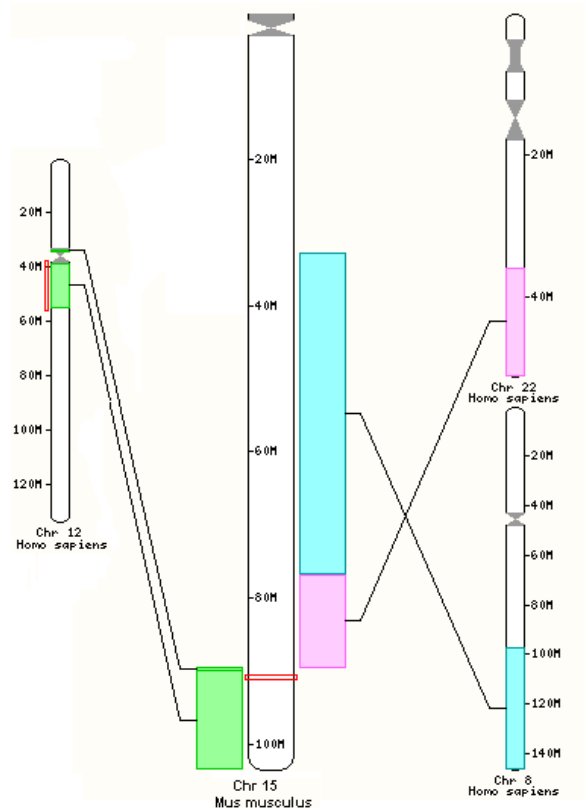
**Figura 5:** Cromatograma com a identificação de heterozigose (G/T) na posição do SNP rs8243603. A posição do SNP está indicada pela seta vermelha.

A análise de ligação foi realizada utilizando sete marcadores microssatélites polimórficos e 1 SNP entre as linhagens BALB/c e C57BL/6. A partir do haplótipo traçado com estes marcadores (Figura 6), foi possível reduzir a região que abriga a mutação *Sacudidor de Cabeça* para um intervalo 9,1Mb, delimitado pelos marcadores D15Mit242 e o SNP rs8243603.



**Figura 6:** Haplótipo resultante do mapeamento genético da mutação *Sacudidor de Cabeça*. Estão representando os 171 animais testados. Os quadrados verdes indicam homozigose C57BL/6. Os quadrados claros indicam heterozigose para BALB/c e C57BL/6. Os números abaixo de cada coluna indicam o número de animais que apresentam o mesmo padrão genotípico. A região onde se encontra o *locus Sacc* foi delimitada entre os marcadores destacados em vermelho.

O intervalo delimitado compreende 11cM (9,3Mb), está localizado na porção telomérica do cromossomo 15 e apresenta homologia com os cromossomos 8q, 12q e 22q em humanos (Figura 7).



**Figura 7:** Regiões de sintenia entre a região mapeada para a mutação *Sacudidor de Cabeça* e os cromossomos humanos.

### 7.2.1. Gene Candidatos

A análise do conteúdo genômico da região mapeada permitiu identificar 95 genes de função conhecida (Anexo 3). Os dados relativos à localização dos genes se encontram hoje disponíveis em bancos de dados especializados. No caso do camundongo, o *Mouse Genome Informatics* (MGI) apresenta a localização cromossômica de milhares de genes e marcadores genéticos.

A escolha de genes candidatos levou em consideração tanto a localização do gene dentro da região mapeada, quanto as informações funcionais prévias

relacionadas aos genes disponíveis na literatura. A partir da observação fenotípica do camundongo *Sacudidor de Cabeça*, foi feita uma avaliação de quais seriam os possíveis genes candidatos para a mutação. Foram selecionados cinco genes candidatos por apresentarem expressão no sistema nervoso, atuarem na morfologia ou sinalização neuronal e já possuírem alguma associação descrita com distúrbios humanos. Estes genes encontram-se listados na tabela 10.

**Tabela 10:** Genes candidatos à mutação *Sacudidor de Cabeça*

<b>MGI ID</b>	<b>Nome</b>	<b>Localização (Mb)</b>
<b><i>Kif21a</i></b>	Kinesin Family member 21A	90,7
<b><i>Lrrk2</i></b>	Leucine-rich Repeat Kinase 2	91,5
<b><i>Slc38a</i></b>	Solute Carrier Family 38	96,4
<b><i>Cacnb3</i></b>	Calcium Channel, Voltage- dependent, beta 3 subunit	98,4
<b><i>Rnd1</i></b>	Rho Family GTPase 1	98,5

Fonte: [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org); [www.informatics.jax.org](http://www.informatics.jax.org)

O gene *Lrrk2* codifica uma provável proteína quinase. Foi demonstrado que a expressão de *Lrrk2* desempenha papel na regulação da morfologia neuronal (Ramonet *et al.*, 2011) e desempenha um importante papel na fosforilação das proteínas sinucleína e tau. Mutações no gene *Lrrk2* desencadeiam a acumulação dessas proteínas, levando à degeneração dos neurônios e desenvolvimento da Doença de Parkinson (PD) (Ramonet *et al.*, 2011). A PD é uma doença neurodegenerativa de início tardio caracterizada por uma perda progressiva de neurônios dopaminérgicos da substância negra (Zimprich *et al.*, 2004). O advento dos camundongos transgênicos contribuiu para o desenvolvimento de vários novos modelos para a PD. No entanto, nenhum modelo tem sido demonstrado para reproduzir fielmente a gama de sintomas observados na PD humana, sendo que a maioria destes modelos apresentam um fenótipo motor básico evidenciado pela diminuição da atividade locomotora (Taylor *et al.*, 2010).

O gene *Slc38a* atua como transportador transmembrana de aminoácidos e tem função pouco conhecida. Os transportadores da família *Slc38* participam de várias vias fisiológicas, incluindo a transferência de glutamina dos astrócitos para os neurônios no SNC (Mackenzie *et al.*, 2004).

O gene *Cacnb3* codifica canais de cálcio voltagem-dependentes e contribui para o funcionamento dos mesmos, aumentando o pico da corrente iônica e alterando as voltagens necessárias para ativação e inativação destes canais. Os canais de cálcio estão envolvidos em numerosas funções celulares, incluindo a proliferação e diferenciação, a excitabilidade da membrana, o crescimento de neuritos, transdução de sinal e sinaptogênese. Mutações em distintas subunidades de canais  $Ca^{2+}$  foram demonstradas associadas ao aparecimento de convulsões em diferentes modelos animais (Burgess *et al.*, 1999).

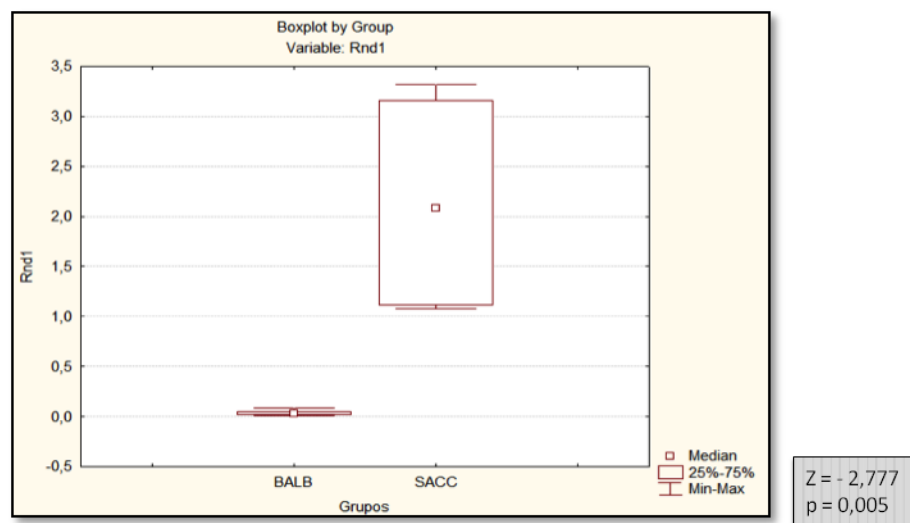
O gene *Kif21a* atua como catalisador de transporte sináptico ao longo dos microtúbulos, acoplado à hidrólise do trifosfato de nucleosídeos. Existem oito genes da família KIF com expressão no cérebro dos camundongos, incluindo *Kif21a*, detectado em cérebros de camundongos adultos (Miki *et al.*, 2001). *Kif21a* codifica um kinesina motora, encontrada em todo o neurônio, e está envolvido no transporte axonal anterógrada. As mutações familiares e *de novo* relatadas até o momento estão relacionadas com distúrbios de estrabismo que parecem resultar de um mau desenvolvimento dos núcleos oculares e nervos adjacentes (Chan *et al.*, 2007).

O gene *Rnd1* pertence à família das Rho GTPases e desempenha um importante papel na morfogênese celular ao atuar na reorganização do citoesqueleto de actina (Ishikawa *et al.*, 2006). O gene *Rnd1* é expresso principalmente no córtex cerebral e hipocampo durante a etapa de formação de sinapse e induz a formação de processos neuronais (Ishikawa *et al.*, 2003).

### 7.3. PCR em Tempo Real

A quantidade relativa de transcrito encontrada para cada um dos cinco genes candidatos, dentro dos grupos controle e mutante, foi analisada quanto à normalidade com os testes de *Komolgorov-Smirnov* e *Shapiro-Wilk*, e os grupos comparados com os testes *U de Mann Whitney* ou *t de Student*. Os genes *Lrrk2*, *Slc38a*, *Cacnb3* apresentaram distribuição normal e foram comparados com o teste *t*

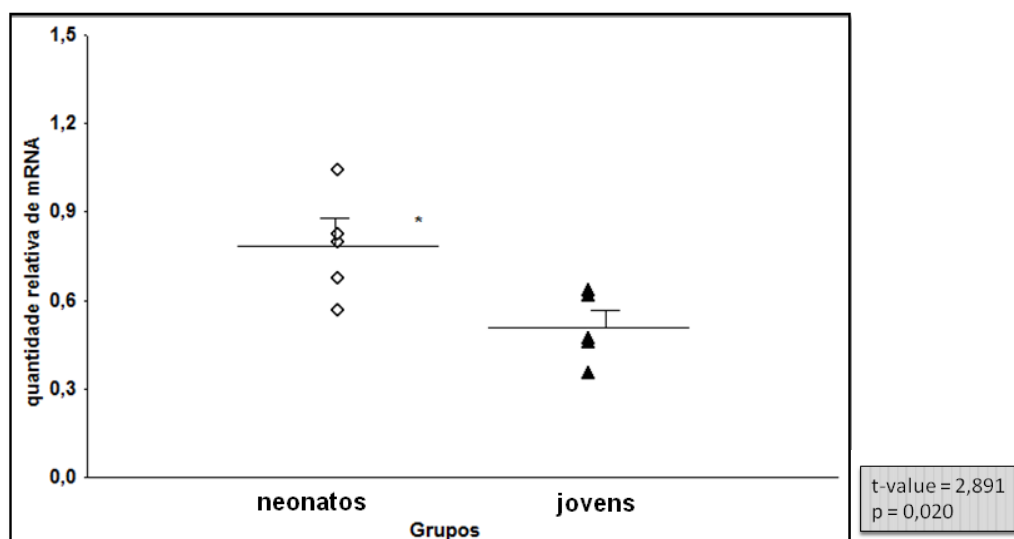
de Student. Nenhuma diferença significativa foi observada. Os genes *Kif21a* e *Rnd1* tiveram uma distribuição não normal e foram analisados pelo teste *U de Mann Whitney*. Nenhuma diferença significativa entre os grupos foi encontrada para o gene *Kif21a*. A quantidade de transcrito do gene *Rnd1* foi significativamente diferente entre os grupos, apresentando-se 2 vezes aumentada nos camundongos *Sacudidor de Cabeça* (Figura 8). Este resultado tornou o gene *Rnd1* o forte candidato para abrigar a mutação responsável pelo fenótipo *Sacudidor de Cabeça*.



**Figura 8:** Boxplot representativo dos níveis de transcrito para o gene *Rnd1* entre animais controles e mutantes, em idade adulta e sexo não padronizado. Estão demonstrados níveis significativamente elevados de transcrito *Rnd1* nos animais mutantes. Dados obtidos por PCR em Tempo Real. Foi realizado o teste de *Komolgorov-Smirnov*, e a quantidade relativa de mRNA comparada entre os grupos pelo teste *Teste de U de Mann Whitney*. As análises foram realizadas com o programa *STATISTICA 6.1* (Stasoft, São Caetano do Sul, Brasil) e o nível de significância mantido foi  $p < 0,05$ .  $n = 5$ .

A quantidade relativa de transcrito *Rnd1* em amostras de cérebro, entre animais normais BALB/c neonatos e jovens, apresentou distribuição normal foi comparada com o teste *t de Student*. Foi encontrada diferença significativa entre os grupos, sendo a quantidade de transcrito encontrada aumentada nos camundongos neonatos (Figura 9).





**Figura 9:** Quantidade relativa de mRNA *Rnd1* encontrada entre camundongos normais BALB/c neonatos e jovens. Estão demonstrados níveis significativamente elevados de transcrito *Rnd1* nos animais neonatos. Foi considerado como neonatos (7-10 dias) e jovens (40 dias). Dados obtidos por PCR em Tempo Real. Foi realizado o teste de *Komolgorov-Smirnov*, e a quantidade relativa de mRNA comparada entre os grupos pelo teste *Teste de t de Student*. As análises foram realizadas com o programa *STATISTICA 6.1* (Stasoft, São Caetano do Sul, Brasil) e o nível de significância mantido foi  $p < 0,05$ .  $n = 5$ .

#### 7.4. O gene *Rnd1*

O gene *Rnd1* (Rho Family GTPases 1 - MGI:2444878) pertence à família das Rho small GTPases. O gene *Rnd1* tem 14 kb, e seus 5 éxons codificam uma proteína com 232 aminoácidos. Três diferentes transcritos foram descritos para o gene. *Rnd1* é altamente conservado em humanos, chimpanzé, cachorro, vaca, ratos e zebrafish.

Membros da família de Rho Small GTPases estão relacionados com alterações morfológicas de diversas células através da reorganização do citoesqueleto de actina (Ishikawa *et al.*, 2006) (Li *et al.*, 2009). Rho Small GTPases atuam como interruptores moleculares intracelulares que alternam entre o estado ativo (ligada a

GTP) e o estado inativo (ligada a GDP) e assim traduzem os estímulos extracelulares para o citoesqueleto de actina e o núcleo (Luo, 2000). Grande parte dos membros Rho GTPases encontram-se no citoplasma no estado inativo e na membrana plasmática no estado ativo (Momboisse *et al.*, 2011).

As *small GTPases* são encontradas em células eucarióticas de leveduras até humanos. Já foram identificadas 20 proteínas da família Rho GTPases em mamíferos (Negishi *et al.*, 2005 e Luo, 2000) e são altamente conservadas entre as espécies (Momboisse *et al.*, 2011).

Rho GTPases controlam processos celulares essenciais incluindo a dinâmica da actina, ciclo celular, transcrição gênica e ativação enzimática. Conseqüentemente, estas moléculas estão implicadas na morfogênese, adesão, diferenciação, polaridade, migração e no transporte entre membranas (Momboisse *et al.*, 2011).

Em células neuronais, considera-se que proteínas Rho estão envolvidas na regulação do desenvolvimento neuronal, incluindo migração, polaridade, crescimento e orientação de axônios, plasticidade dendrítica e formação da sinapse (Luo, 2000) (Momboisse *et al.*, 2011). A morfologia de axônios e dendritos são determinadas primeiramente pela estrutura de citoesqueleto subjacente, o que demonstra o impacto importante das Rho GTPases no processo de formação neuronal (Watabe-Uchida *et al.*, 2006).

A subfamília Rnd representa um novo ramo dentro da família das pequenas Rho GTPases e consiste de três proteínas em humanos: *Rnd1/Rho6* e *Rnd2/Rho7* e *Rnd3/Rho8/RhoE*, cujas funções são pouco conhecidas (Chardin, 2006) (Ishikawa *et al.*, 2006). *RND1* e *RND2* são expressas principalmente no cérebro enquanto *RND3* é expressa sistemicamente (Ishikawa *et al.*, 2003).

Diferente de outras Rho GTPases, a subfamília Rnd possui baixa atividade intrínseca de GTPase e permanecem constitutivamente ligadas a GTP, indicando que são moléculas constitutivamente ativas (Ishikawa *et al.*, 2006) e não são reguladas por efetores (Chardin, 2006).

Proteínas RND foram observadas apenas em vertebrados e este aparecimento relativamente recente de proteínas Rnd na evolução indica que elas podem estar envolvidas em funções sofisticadas ou especializadas do citoesqueleto, por exemplo, na plasticidade neuronal (Chardin, 2006).

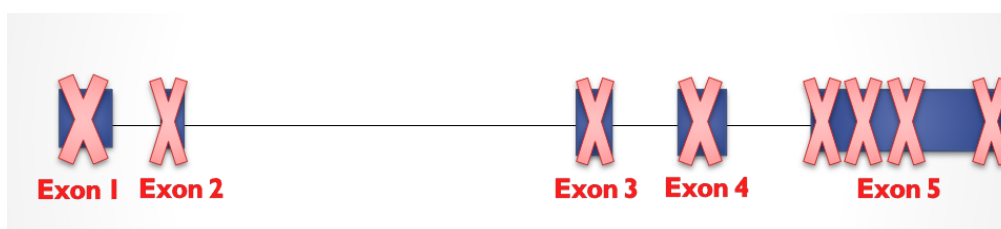
Foi demonstrado que o gene *Rnd1* é altamente expresso no córtex cerebral e hipocampo, mais precisamente em neurônios, durante o desenvolvimento do cérebro e o estágio de formação de sinapse. Foi demonstrado que a expressão de mRNA *Rnd1* em ratos é baixa durante o estágio embrionário e aumenta gradualmente durante o período pós-natal, com pico de expressão em p14 e declínio no animal adulto (Ishikawa *et al.*, 2003). *Rnd1* inibe a formação e promove a desmontagem de fibras de stress de actina e complexos de adesão focal, levando à retração celular (Nobes, 1998) (Aoki *et al.*, 2000). *Rnd1* ainda é encontrada associada a junções aderentes em fibroblastos e células epiteliais e sua super expressão em fibroblastos em crescimento induz a perda de polimerização da estrutura de actina e adesão focal, levando a perda severa de adesão célula matriz. Desde modo, *Rnd1* atua como regulador negativo da estrutura de actina e adesão celular (Watabe-Uchida *et al.*, 2006).

A função neuronal de *Rnd1* foi evidenciada ao demonstrar sua capacidade de indução de formação de processos neuronais em células PC12 (Aoki *et al.*, 2000). GTPase *Rnd1* atua essencialmente na regulação do crescimento de neuritos, desenvolvimento dendrítico e orientação de axônios. A super expressão de *Rnd1* em culturas de neurônios do hipocampo demonstrou maior complexidade na morfologia dendrítica com a observação da alongação de espinhas dendríticas, indução da formação de múltiplos axônios e aumento no número de ramificações (Li *et al.*, 2009).

Entretanto, os mecanismos pelos quais o gene regula o desenvolvimento dendrítico incluindo sua morfogênese ainda permanece desconhecido (Ishikawa *et al.*, 2006), bem como ainda não é claro como a atividade de *Rnd1* é regulada (Aoki *et al.*, 2000). O camundongo *Sacudidor de Cabeça* pode ser um bom modelo para o estudo funcional do gene *Rnd1* e a elucidação destes mecanismos de regulação de morfogênese neuronal e sua implicação em distúrbios do sistema nervoso.

### 7.5. Sequenciamento do gene *Rnd1*

Foi sequenciado 90% do gene *Rnd1*, cobrindo os 5 éxons, regiões 3' UTR e 5' UTR e todas as regiões flanqueadoras dos éxons. O alinhamento das sequências de DNA dos animais *Sacudidor de Cabeça* foi realizado contra as sequências controle BALB/c obtidas no mesmo experimento e a sequência disponível para a linhagem no banco de dados online MGI. Até o momento, nenhuma alteração nucleotídica foi observada (Figura 10).



**Figura 10:** Representação esquemática do gene *Rnd1* e seus 5 éxons. A grande maioria do gene já foi seqüenciada, restando apenas um fragmento no éxon 5.

### 7.6 Cultura de Células Granulares do Cerebelo

Foi iniciado o processo de padronização da cultura de células granulares do cerebelo com animais controles BALB/c, com 7-10 dias de vida. O número limitado de animais mutantes nesta idade impossibilitou a realização do experimento.

## 8. Discussão

Os camundongos *Sacudidor de Cabeça* apresentam um movimento anormal de cabeça e pescoço, apresentado a partir do oitavo dia de vida. A observação detalhada dos cruzamentos dos mutantes revelou outras características peculiares. Em geral, o número de filhotes por ninhada apresenta-se menor do que o observado normalmente para a linhagem BALB/c, sendo em média de 3 filhotes. Os cruzamentos observados foram entre casais *Sacc*; fêmea *Sacc* e macho normal; e fêmea normal e macho *Sacc*. Alguns filhotes P1-P3 foram encontrados mortos na gaiola, muitas vezes com indicação de ausência de amamentação. Não é sabido se a causa das mortes está relacionada com um aparente cuidado parental reduzido das fêmeas *Sacc*, ou com alguma outra deficiência no desenvolvimento do próprio filhote. Um camundongo macho mutante observado apresenta hiperatividade e agressividade ao realizar comportamentos de remoção do pêlo da face e lesão nas caudas dos outros animais na mesma gaiola. Mais animais devem ser observados quanto a estes comportamentos sociais que podem auxiliar no entendimento do fenótipo.

O mapeamento genético, utilizando de marcadores moleculares microssatélites e SNPs, permitiu reduzir a região que abriga a mutação *Sacudidor de Cabeça* a um intervalo mínimo. A região foi mapeada na porção telomérica do cromossomo 15, delimitada pelo marcador D15Mit242 e o SNP rs8243603, compreendendo um intervalo de 11,0 cM ou 9,1 Mb. A região é dita mínima uma vez que não foram encontrados outros marcadores moleculares polimórficos dentro da região que permitissem um maior refinamento do mapeamento.

A análise do conteúdo genômico da região mapeada revelou 95 genes de função conhecida, que atuam em diferentes tecidos e nos mais diversos processos biológicos dos organismos. Entre estes genes, foram isolados aqueles que apresentam expressão no sistema nervoso e/ou que já estejam associados com patologias em humanos. Foram selecionados dos genes: *Kif21a*, *Lrrk2*, *Slc38a*, *Cacnb3* e *Rnd1*. Este critério de seleção foi utilizado de acordo com a observação do fenótipo *Sacudidor de Cabeça*, que sugere um distúrbio neurológico, para seleção e estudo de alguns genes candidatos. Os demais genes não podem ser excluídos da

possibilidade de estarem envolvidos no desenvolvimento do fenótipo e devem ser revistos se os genes selecionados neste primeiro passo forem descartados.

Os cinco genes selecionados foram analisados quanto à quantidade relativa de transcrito, entre animais em mutantes e controles BALB/c. As análises de PCR em Tempo Real revelaram uma quantidade aumentada de transcrito *Rnd1* nas amostras de cerebelo de camundongos *Sacc*. Este resultado permitiu isolar o gene *Rnd1* como o forte candidato para abrigar a mutação responsável pelo fenótipo *Sacudidor de Cabeça*. Os outros quatro genes candidatos não apresentaram diferença significativa nos níveis de transcrito entre os grupos. O estudo foi realizado com camundongos em idade adulta (79-80 dias) e o sexo não foi padronizado.

A quantidade basal de transcrito *Rnd1* encontrada nos animais controle BALB/c em idade adulta neste estudo, corrobora com os dados de expressão do gene disponíveis na literatura científica. Estudos anteriores demonstraram que a expressão de mRNA *Rnd1* em ratos é baixa durante o estágio embrionário e aumenta gradualmente durante o período pós-natal, com pico de expressão em p14 e declínio no animal adulto (Ishikawa *et al.*, 2003). Análises adicionais de PCR em Tempo Real, em amostras de cérebro, permitiram confirmar este padrão de expressão descrito para o gene *Rnd1*. Foi observada uma diminuição significativa dos níveis de transcrito do gene de acordo com o aumento da idade do animal. Um maior nível de transcrito *Rnd1* foi encontrado para o grupo de animais neonatos, quando comparados com animais jovens, ambos BALB/c normais. Foi considerado como neonatos a idade de 7-10 dias e como jovens, 40 dias.

O gene *Rnd1* pertence à família das Rho small GTPases e desempenha um importante papel na morfogênese celular e neuronal ao atuar na reorganização do citoesqueleto de actina. *Rnd1* é altamente expresso no córtex cerebral e hipocampo, principalmente em neurônios, durante o desenvolvimento do cérebro e o estágio de formação de sinapse (Ishikawa *et al.*, 2003).

A maioria das mutações geradas pelo mutágeno ENU já identificadas se encontram em regiões codificantes e flaqueadoras dos éxons, e portanto, estas foram as primeiras regiões seqüenciadas do gene *Rnd1*. Entretanto, nenhuma alteração nucleotídica foi observada no seqüenciamento destas regiões. Deve-se então partir para o seqüenciamento das regiões intrônicas e, principalmente, das regiões regulatórias do gene. A quantidade aumentada de transcrito *Rnd1*

observada pode ser acarretada por alguma alteração em região regulatória que esteja modificando o seu padrão de expressão ou que influencie no processo de transcrição gênica, sendo a região promotora forte candidata. Ainda não é claro como a atividade de *Rnd1* é regulada (Aoki *et al.*, 2000) e pouco é conhecido sobre como os promotores de proteínas Rnd são regulados por diversos estímulos e pelos fatores de transcrição (Riou, 2010). Achados de alterações nestas regiões poderiam contribuir imensamente para o estudo dos processos regulatórios nos organismos.

Outro mecanismo importante a ser investigado é a regulação por micro RNAs. Os miRNAs são pequenos fragmentos de RNA que estão envolvidos na regulação da expressão gênica ao nível transcrisional. Uma alteração no sítio de ligação no mRNA *Rnd1* de algum miRNA poderia ser responsável pelo seu mal pareamento, impossibilitando o silenciamento gênico, o que levaria ao aumento da quantidade de transcrito. Esta constitui-se uma hipótese plausível que deve ser estudada para o entendimento dos mecanismos subjacentes à quantidade aumentada de transcrito *Rnd1* encontrada nos animais *Sacudidor de Cabeça*.

A importância da sinalização realizada por proteínas membros da família Rho no desenvolvimento neuronal é elucidada pelos achados de mutações em seus reguladores e efetores, que acarretam várias desordens neurológicas no homem (Newey, 2005) (Luo, 2000). Estudos genéticos elucidaram associação entre o retardo mental e mutações em genes efetores e reguladores de Rho GTPases (Momboisse *et al.*, 2011). Crianças com retardo mental apresentam severas reduções nas ramificações dendrítica, o que demonstra uma forte conexão entre estrutura neuronal e habilidade cognitiva (Kaufmann *et al.*, 2000). As semaphorinas são uma classe de proteínas cuja função depende da interação com Rho GTPases. O gene da Semaphorina 5A foi encontrado com expressão reduzida no cérebro de pacientes com autismo, desordem do desenvolvimento neuronal caracterizada por redução do comportamento social e estereotípias. Desde modo, observa-se que tanto o aumento como a diminuição da expressão de genes mutados na via sinalizadora de Rho GTPase podem levar a uma função mental anormal. (Luo, 2000) (Negishi *et al.*, 2005).

O movimento anormal característico do camundongo *Sacudidor de Cabeça* pode ser considerado como uma estereotípias devido ao seu padrão constante do movimento. Os tiques ou estereotípias são movimentos anormais já observados em

algumas doenças neuropsiquiátricas como o autismo e o retardo mental. São comportamentos observados nas mesmas doenças já associadas com as mutações em genes da família das Rho GTPases.

Desta forma, fazem-se necessários estudos aprofundados do impacto da quantidade aumentada de mRNA *Rnd1* encontrada nos animais *Sacudidor de Cabeça*, bem como testes comportamentais e cognitivos nos animais mutados. Espera-se compreender se existe algum prejuízo cognitivo relacionado com o fenótipo e se este pode ser relacionado com alguma patologia cognitiva observada no homem.

Novos experimentos de PCR em Tempo Real entre grupos controle e *Sacc* em diferentes idades poderão contribuir para o entendimento da manifestação do fenótipo *Sacudidor de Cabeça*, considerando que o movimento anormal de cabeça e pescoço é apresentado a partir do oitavo dia de vida, ou seja, no período pós-natal. Estudos protéicos, como testes de Western blotting, são necessários para compreender se o nível aumentado de transcrito *Rnd1* encontrado nos animais *Sacudidor de Cabeça* está acarretando na super expressão protéica do gene e quais as possíveis conseqüências para o desenvolvimento do fenótipo.

A super expressão de *Rnd1* em culturas de neurônios do hipocampo demonstrou maior complexidade na morfologia dendrítica com a observação da alongação de espinhas dendríticas e aumento no número de ramificações (Ishikawa *et al.*, 2006). A partir do resultado obtido no presente trabalho que demonstrou níveis elevados de transcrito *Rnd1* em amostras do cerebelo, tem-se a perspectiva de fazer a cultura das células granulares do cerebelo para análise da morfologia dos neurônios dos camundongos *Sacudidor de Cabeça*. Estudos do gene *Rnd1* in vivo ainda não foram demonstrados e o modelo *Sacudidor* poderá contribuir imensamente para estudos aprofundados visando a elucidação de processos biológicos relacionados ao desenvolvimento do sistema nervoso.

O movimento anormal de cabeça e pescoço apresentado pelos animais *Sacudidor de Cabeça* já foi observado anteriormente em cavalos. A síndrome de “Headshaking” em eqüinos foi descrita na literatura veterinária a mais de 100 anos. A desordem é caracterizada pelo súbito aparecimento do “sacudir” de cabeça e nariz para cima e para baixo, que muitas vezes vem acompanhado por espirros, bufadas e tentativas de levar a pata ao nariz (Madigan, 1997). Muitas causas já foram



sugeridas para esta síndrome apresentada pelos cavalos, como doenças no ouvido médio ou desordem do nervo cranial, embora poucos casos tenham respondido positivamente ao tratamento apropriado para estes diagnósticos. Ainda não sabe-se se este comportamento pode ter alguma relação com o mutante *Sacudidor de Cabeça*, mas os futuros achados para o mutante podem elucidar e nortear novos estudos associados em outras espécies.

O sistema nervoso é um dos mais complexos do corpo humano, onde podemos encontrar o maior número de genes em funcionamento. A manutenção do funcionamento de um sistema tão complexo requer milhares de genes integrados harmoniosamente sob uma variedade de estímulos. O resultado da quantidade aumentada do transcrito *Rnd1* é extremamente e irá nortear a realização de novos experimentos para investigação do modelo. Concomitantemente, novos genes candidatos podem ser levantados e investigados, principalmente aqueles que participam da via de sinalizadora de Rho, e encontram-se dentro da região mapeada. Neste momento, têm-se em mão a oportunidade de entender mais sobre o mecanismo de ação e regulação da família de Rho GTPase. Se comprovado o envolvimento do gene *Rnd1* no desenvolvimento do fenótipo, maiores estudos *in vivo* do modelo *Sacudidor de Cabeça*, poderão fornecer novos conhecimentos a cerca do desenvolvimento do sistema nervoso e da morfogênese neuronal, bem como a compreensão do estabelecimento de patologias equivalentes no homem.

## 9. Conclusão

A observação fenotípica, mapeamento genético e a identificação da mutação são esforços multidisciplinares na tentativa de descobrir novos genes e criar modelos para o estudo de doenças humanas.

A mutação *Sacudidor de Cabeça* foi mapeada no cromossomo 15, entre os marcadores D15Mit242 e o SNP rs8243603. A região mapeada compreende um intervalo de 11,0 cM como localização do *locus* mutado. O presente projeto apresenta o gene *Rnd1* como o principal candidato posicional para abrigar a mutação responsável pelo fenótipo. Foi demonstrado que os animais mutantes apresentam quantidade aumentada de transcrito *Rnd1* em amostras de cerebelo. As regiões codificantes e flanqueadoras dos éxons do gene *Rnd1* foram seqüenciadas e a mutação ainda não foi encontrada. Espera-se que a identificação e caracterização da mutação *Sacudidor de Cabeça* permita o estudo funcional do gene envolvido e esclareça questões relacionadas ao desenvolvimento do fenótipo.

Como perspectiva para estudos futuros, os resultados desta pesquisa podem contribuir para o uso de novas metodologias para uma maior caracterização molecular e fenotípica do camundongo *Sacudidor de Cabeça*, bem como estudos funcionais do gene *Rnd1* através de experimentos de cultura de células *in vitro* e a interferência de RNA *in vivo*. Deste modo, a caracterização do envolvimento do gene na manifestação do fenótipo *Sacudidor de Cabeça* contribuirá para o entendimento de questões relacionadas ao desenvolvimento do sistema nervoso e para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nas doenças neurológicas humanas.

## 10. Referências Bibliográficas

- AOKI, J., Kato, H., Mori, K., Negishi, M. *Rnd1*, a novel Rho family GTPase, induces the formation of neuritic processes in PC12 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 278: 604-608, 2000.
- BALLING, Rudi; ENU MUTAGENESIS: Analyzing Gene Function in Mice, *Genomics Hum. Genet.* v.2, p.463–92, 2001.
- BECKERS, Johannes; Angelis, M.H., Large-scale mutational analysis for the annotation of the mouse genome, *Current Opinion in Chemical Biology*, v.6, p.17-23, 2001
- BIBANCOS, T.; Jardim, D.L.; Aneas, I.; Chiavegatto, S., Social isolation and expression of serotonergic neurotransmission-related genes in several brain areas of male mice, *Genes, Brain and Behavior*, vol. 6, p. 529-539, 2007.
- BOYD, Yvonne; Genetic Mapping of the Mouse Genome, *METHODS: A Companion to Methods in Enzymology*, v.14, p.120–134, 1998
- CARNEIRO, Juliana Garcia, Mapeamento Genético de Mutação *Sacudidor de Cabeça* Em Camundongos, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, 2006.
- CHAN, Wai-Man; Andrews, C.; Dragan, L.; Fredrick, D.; Armstrong, L.; Lyons, C; Geraghty, M.T.; Hunter, D.G., Three novel mutations in KIF21A highlight the importance of the third coiled-coil stalk domain in the etiology of CFEOM1, *BMC Genetics*, v.8, p.26, 2007
- CHARDIN, P., Function and regulation of Rnd proteins. *Nature reviews. Molecular cell biology*, v.7, n.1, p.54-62, 2006
- CHING, Yung-Hao; Munroe, R.J.; Moran, J.L.; Barker, A.K.; Mauceli, E., High resolution mapping and positional cloning of ENU-induced mutations in the RW region of mouse chromosome 5, *BMC Genetics*, v.11, n.106, 2010
- CHORILLI, M.; Michelin, D.C.; Salgado, H.R.N., Animais de laboratório: o camundongo, *Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, vol. 28, n.1, p.11-23, 2007.
- COPELAND, Neal G.; Jenkins, N.A.; Gilbert, D.J.; Miller, J.C.; Dietrich, W.F, et al. A Genetic Linkage Map of the Mouse: Current Applications and Future Prospects, *Science*, v.262, p.57-65, 1993.
- CORDES, Sabine P., N-Ethyl-N-Nitrosourea Mutagenesis: Boarding the Mouse Mutant Express, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.69, n.3, p.426-439, 2005.
- DIETRICH, William F.; Copeland, N.G.; Gilbert, D.J.; Miller, J.C.; Jenkins, N.A.; Lander, E.S., Mapping the mouse genome: Current status and future prospects, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.92, p.10849-10853, 1995.
- ENSEMBL GENOME BROWSER – <http://www.ensembl.org/index.html>

- GODARD, Ana Lúcia Brunialti, A clonagem posicional – uma abordagem para o estudo do genoma funcional, Monografias SBG, Ribeirão Preto: SBG, 151p., 2008.
- GUÉNET, Jean Louis, The mouse genome, *Genome Research*, v.15, p.1729-1740, 2005.
- GUÉNET, Jean Louis, Animal models of human genetic diseases: do they need to be faithful to be useful?, *Mol Genet Genomics*, v.286, p.1–20, 2011.
- GUNN, Rhian K.; Huentelman, M.J.; Brown, R.E. Are Sema5a mutant mice a good model of autism? A behavioral analysis of sensory systems, emotionality and cognition. *Behavioural Brain Research*, v.225, n.1, p.142-150, 2011
- ISHIKAWA, Y.; Katoh, H.; Negishi, M., A role of *Rnd1* GTPase in dendritic spine formation in hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience*; v.23, n.35, p.11065-72, 2003
- ISHIKAWA, Y.; Katoh, H.; Negishi, M., Small GTPase *Rnd1* is involved in neuronal activity-dependent dendritic development in hippocampal neurons. *Neuroscience letters*, v.400, n.3, p.218-233, 2006
- JUSTICE, M.T. et al. Mouse ENU Mutagenesis. *Human Molecular Genetics*, v.8, n.10, 1999
- KAUFMANN, W.E., Moser, H.W., Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation, v.10, n.10, p.981-91, 2000
- KOHRMAN, D.C.; Smith, M.R.; Goldin, J.H.; Meisler, M.H. A Missense Mutation in the Sodium Channel *Scn8a* Is Responsible for Cerebellar Ataxia in the Mouse Mutant *jolting*, *The Journal of Neuroscience*, v.16, n.19, 1996
- KUMAR, P.; Wu, H.; McBride, J.L.; Jung, K.E.; Kim, M.H.; Davidson, B.L.; Lee, S.K.; Shankar, P.; Manjunath, N.; Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system, *Nature*, v.448(7149), p.39-43, 2007
- LETTIS, V.A. Stargazer – A mouse to seize!, *Epilepsy Currents*, v.5, n.5, p161-165, 2005
- LI, Y., Ghavampur, S.; Bondallaz, P.; Will, L.; Grenningloh, G.; Puschel, A.; *Rnd1* Regulates Axon Extension by Enhancing the Microtubule Destabilizing Activity of SCG10. *The Journal of Biological Chemistry*, v.284, n.1, p.363-371, 2009
- LUO, L., Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nature reviews Neuroscience*, v.1, n.3, p.173-180, 2000
- MACKENZIE, B.; Erickson, J.D. Sodium-coupled neutral amino acid (System N/A) transporters of the SLC38 gene family. *European Journal of Physiology*, v.447, p.784-795, 2004
- MASSIRONI, S.M.G.; Reis, B.L.F.S.; Carneiro, J.G.; Barbosa, L.B.S.; 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 and Biological Research*, v.39, p.1217-1226, 2006.
- MGI – MOUSE GENOME INFORMATICS – <http://www.informatics.jax.org/>

MIKI, H.; Setou, M.; Kaneshiro, K.; Hirokawa, N. All kinesin superfamily protein, KIF genes in mouse and human. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; v.98, n.13, 2001

MOMBOISSE, F., Houy, S., Ory, S., Calco, V., Bader, M., Gasman, S., How important are Rho GTPases in neurosecretion?, *Journal of neurochemistry*, v.117, n.4, p.623-631, 2011

MOORE, Karen J.; Utilization of Mouse Models in Discovery of Human Disease Genes, *Research Focus*, v.4, n.3, p.123-128, 1999

NEGISHI M., Katoh, H., Rho Family GTPases and Dendrite Plasticity, *The Neuroscientist*, v.11, n.3, 2005

NEGISHI M., Katoh, H., Rho Family GTPases as Key Regulators for Neuronal Network Formation, *J. Biochem. Review*, v.132, p.157-166, 2002

NEWAY, S.E.; Velamoor, V.; Govek, E.; Van Aelst, L., Rho GTPases, dendritic structure, and mental retardation, *Journal of Neurobiology*, v.64, n.1, p.58-74, 2005

NOBES, C. D., Lauritzen, I., Mattei, M.-G., Paris, S., Hall, A., Chardin, P. A new member of the Rho family, *Rnd1*, promotes disassembly of actin filament structures and loss of cell adhesion, *J. Cell Biol.*, v.141, p.187-197, 1998.

PAU, Henry; HAWKER, Kelvin; FUCHS, Helmut; ANGELIS, Martin H.; STEEL, Karen P. Characterization of a New Mouse Mutant, Flouncer, with a Balance Defect and Inner Ear Malformation, *Otology & Neurotology*, v.25, p.707-713, 2004.

RAMONET, D.; Daher, J.P.L.; Lin, B.M., Dopaminergic neuronal loss, reduced neurite complexity and autophagic abnormalities in transgenic mice expressing G2019S mutant LRRK2, *PLoS one*, v.6, n.4, 2011

RIOU, Philippe; Villalonga, P.; Ridley, A.J. Rnd proteins: Multifunctional regulators of the cytoskeleton and cell cycle progression, *Bioessays*, v.32, p.986-992, 2010

TAYLOR, T.N.; Greene, J.G.; Miller, G.W., Behavioral phenotyping of mouse models of Parkinson's disease, *Behavioural Brain Research*, v.211, n.1, p.1-10, 2010

VANDESOMPELE, J.; Preter, K.; Pattyn, F.; Poppe, B.; Van Roy, N.; De Paepe, A.; Speleman, F., Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, *Genome Biology*, v.3, n. 7, 2002

WATABE-UCHIDA, M., Govek, E., Aelst, L. Regulators of Rho GTPases in Neuronal Development, *The Journal of Neuroscience*, v.26, n.42, p10633-10635, 2006

ZIMPRICH, A.; Biskup, A.; Leltner, P.; Lichtner, P.; Farrer, M.; Lincoln, S.; Kachergus, J.; Hullhan, M.; Uliti, R.J.; Caine, D.B.; Stoessi, A.J.; Pfeiffer, R.F.; Patenje, N.; Carbajal, I.C.; Vlergge, P.; Asmus, F., Mutations in LRRK2 Cause Autosomal-Dominant Parkinsonism with Pleiomorphic Pathology, *Neuron*, p.44, p.601-607, 2004

## 11. Anexos

### 11.1 Anexo 1

Lista de iniciadores utilizados no sequenciamento do gene *Rnd1*.

Exons	Iniciador	Sequência (5' – 3')	Tamanho do fragmento
<b><i>Rnd1</i>-Exon1F</b>	Senso	CGCCTCCTCTTGTGATTG	390 pb
<b><i>Rnd1</i>-Exon1R</b>	Anti-senso	CAGTCCTCCAGCCAGAAG	
<b><i>Rnd1</i>-Exon2F</b>	Senso	CTTGGTGTGGGGTTCTGA	281 pb
<b><i>Rnd1</i>-Exon2R</b>	Anti-senso	ATTCTTTCCTTCGCTTTCCT	
<b><i>Rnd1</i>-Exon3F</b>	Senso	CCATGAAGGGATCAAAGATT	358 pb
<b><i>Rnd1</i>-Exon3R</b>	Anti-senso	ATTCTCTGATCTCGGACTGG	
<b><i>Rnd1</i>-Exon4F</b>	Senso	GGGCAGGAAGATGATGTAAT	635 pb
<b><i>Rnd1</i>-Exon4R</b>	Anti-senso	CTGAGTTCTGGGATTACAAA	
<b><i>Rnd1</i>-Exon5A-F</b>	Senso	CGAACAGACACTTGAGAGGA	511 pb
<b><i>Rnd1</i>-Exon5A-R</b>	Anti-senso	GGCATCTTCTTCAGTTCCAT	
<b><i>Rnd1</i>-Exon5B-F</b>	Senso	GCCACAGAGGACTTTAGAAG	405 pb
<b><i>Rnd1</i>-Exon5B-R</b>	Anti-senso	TTAGGC AAAAATGAGGGTT	
<b><i>Rnd1</i>-Exon5C-F</b>	Senso	GTCCTTGATCCCTTCTCTT	503 pb
<b><i>Rnd1</i>-Exon5C-R</b>	Anti-senso	ATCGCCATAAAAACCAAAGA	
<b><i>Rnd1</i>-Exon5D-F</b>	Senso	CTTTGGTTTTTATGGCGAT	314 pb
<b><i>Rnd1</i>-Exon5D-R</b>	Anti-senso	CAGGTGGGATTCAGAGAAGT	
<b><i>Rnd1</i>-Exon5E-F</b>	Senso	GGTCCCCTAGCATCTTGT	378 pb
<b><i>Rnd1</i>-Exon5E-R</b>	Anti-senso	TTATGAAGTGGCAGCAAAAA	
<b><i>Rnd1</i>-Exon6A-F</b>	Senso	CCAGAGTGAAAAACCAGACC	637 pb
<b><i>Rnd1</i>-Exon6A-R</b>	Anti-senso	AGGATGAATGCCTGAACAAC	
<b><i>Rnd1</i>-Exon6B-F</b>	Senso	AGGGAAACCTCTGAAATGT	649 pb
<b><i>Rnd1</i>-Exon6B-R</b>	Anti-senso	GGTCTTCTGGGTAATGTGG	

## 11.2. Anexo 2

Lista de iniciadores utilizados para PCR em Tempo Real.

Exons	Iniciador	Sequência (5' – 3')	Tamanho do fragmento
<b>Cacnb3</b>	Senso	CTCCAGGGGAAAGTCACAGA	141 pb
	Anti-senso	TATTCAGCCAGGTGCTCACA	
<b>Kif21a</b>	Senso	AGGCTCCTCAAAAACCAGTC	124 pb
	Anti-senso	GGGCTTTCTCCTGCTCTTCT	
<b>Rnd1</b>	Senso	AACTGTCCCACCAGAAGCAG	92 pb
	Anti-senso	CGAGCCCTCCAGGTAGATTT	
<b>Lrrk2</b>	Senso	GGGGTACAAGCGGAAGAGTA	94 pb
	Anti-senso	CACCTCGTGTGGAAGATTGA	
<b>Slc38a1</b>	Senso	CGAACCAGGACGGAGATAAA	114 pb
	Anti-senso	AGCAAGCCCAGTCGTAGATG	

### 11.3. Anexo 3

Lista dos 95 genes localizados entre os marcadores D15Mit242 e rs8243603, no cromossomo 15 murino. Estão em destaque os genes selecionados como candidatos à mutação *Sacudidor de Cabeça*.

cM	Gene
45.21	Cpne8, copine VIII
45.86	<b>Kif21a, kinesin family member 21A</b>
46.0	Abcd2, ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 2
46.05	Slc2a13, solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 13
46.07	<b>Lrrk2, leucine-rich repeat kinase 2</b>
46.14	Muc19, mucin 19
46.14	Smgc, submandibular gland protein C
46.39	Cntn1, contactin 1
46.53	Pdzrn4, PDZ domain containing RING finger 4
47.34	Gxylt1, glucoside xylosyltransferase 1
47.39	Yaf2, YY1 associated factor 2
47.53	Zcrb1, zinc finger CCHC-type and RNA binding motif 1
47.55	Pphln1, periphilin 1
47.69	Prickle1, prickle homolog 1 (Drosophila)
48.2	Adamts20, a disintegrin-like and metalloproteinase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 20
48.52	Pus7l, pseudouridylate synthase 7 homolog (S. cerevisiae)-like
48.55	Irak4, interleukin-1 receptor-associated kinase 4
48.59	Twf1, twinfilin, actin-binding protein, homolog 1 (Drosophila)
48.65	Tmem117, transmembrane protein 117
49.39	Nell2, NEL-like 2 (chicken)
50.47	Dbx2, developing brain homeobox 2
50.66	Ano6, anoctamin 6
52.37	Arid2, AT rich interactive domain 2 (ARID, RFX-like)
52.44	Scaf11, SR-related CTD-associated factor 11
52.53	<b>Slc38a1, solute carrier family 38, member 1</b>
52.6	Slc38a2, solute carrier family 38, member 2
52.77	Slc38a4, solute carrier family 38, member 4
52.91	Amigo2, adhesion molecule with Ig like domain 2
52.91	Fam113b, family with sequence similarity 113, member B
53.54	Rpap3, RNA polymerase II associated protein 3
53.7	Endou, endonuclease, polyU-specific
53.74	Rapgef3, Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 3
53.78	Slc48a1, solute carrier family 48 (heme transporter), member 1



53.79	Hdac7, histone deacetylase 7
53.81	Gm17532, predicted gene, 17532
53.85	Vdr, vitamin D receptor
53.96	Tmem106c, transmembrane protein 106C
53.97	Col2a1, collagen, type II, alpha 1
54.04	Senp1, SUMO1/sentrin specific peptidase 1
54.09	Pfkm, phosphofructokinase, muscle
54.13	Asb8, ankyrin repeat and SOCS box-containing 8
54.17	AI836003, expressed sequence AI836003
54.19	Olfr288, olfactory receptor 288
54.21	Olfr287, olfactory receptor 287
54.23	Olfr286, olfactory receptor 286
54.26	H1fnt, H1 histone family, member N, testis-specific
54.29	Zfp641, zinc finger protein 641
54.31	Olfr285, olfactory receptor 285
54.34	Olfr284, olfactory receptor 284
54.38	Olfr283, olfactory receptor 283
54.44	Olfr282, olfactory receptor 282
54.46	Olfr281, olfactory receptor 281
54.48	Lalba, lactalbumin, alpha
54.5	Olfr279, olfactory receptor 279
54.52	Kansl2, KAT8 regulatory NSL complex subunit 2
54.54	Ccnt1, cyclin T1
54.57	4930415O20Rik, RIKEN cDNA 4930415O20 gene
54.59	Adcy6, adenylate cyclase 6
54.64	<b>Cacnb3, calcium channel, voltage-dependent, beta 3 subunit</b>
54.65	Arf3, ADP-ribosylation factor 3
54.65	Ccdc65, coiled-coil domain containing 65
54.65	Ddx23, DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 23
54.65	Fkbp11, FK506 binding protein 11
54.65	<b>Rnd1, Rho family GTPase 1</b>
54.65	Wnt1, wingless-related MMTV integration site 1
54.65	Wnt10b, wingless related MMTV integration site 10b
54.69	Ddn, dendrin
54.73	Prkag1, protein kinase, AMP-activated, gamma 1 non-catalytic subunit
54.8	Mll2, myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 2
54.99	Rheb1, Ras homolog enriched in brain like 1
55.05	Dhh, desert hedgehog
55.1	Lmbr1l, limb region 1 like
55.21	Tuba1b, tubulin, alpha 1B
55.29	Tuba1a, tubulin, alpha 1A
55.52	Gm8973, predicted gene 8973
55.61	Tuba1c, tubulin, alpha 1C
55.72	Prph, peripherin

55.8	Troap, trophinin associated protein
55.84	C1ql4, complement component 1, q subcomponent-like 4
55.87	Dnajc22, DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 22
56.01	Spats2, spermatogenesis associated, serine-rich 2
56.08	Kcnh3, potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 3
56.09	Mcrs1, microspherule protein 1
56.11	Fam186b, family with sequence similarity 186, member B
56.13	Accn2, amiloride-sensitive cation channel 2, neuronal
56.13	Aqp2, aquaporin 2
56.13	Aqp5, aquaporin 5
56.13	Aqp6, aquaporin 6
56.13	Bcdin3d, BCDIN3 domain containing
56.13	Faim2, Fas apoptotic inhibitory molecule 2
56.13	Fmnl3, formin-like 3
56.13	Nckap5l, NCK-associated protein 5-like
56.13	Prpf40b, PRP40 pre-mRNA processing factor 40 homolog B (yeast)
56.13	Racgap1, Rac GTPase-activating protein 1
56.13	Tmbim6, transmembrane BAX inhibitor motif containing 6

Fonte: Mouse Genome Informatics