



Universidade Estadual de Campinas

Faculdade de Ciências Médicas

Marcella Bergamini de Baptista

Gangliosidose GM1: proposta de estudo em modelo animal utilizando o *Danio rerio*

CAMPINAS

2017

Marcella Bergamini de Baptista

Gangliosidose GM1: proposta de estudo em modelo animal utilizando o *Danio rerio*

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências, Área de Concentração Genética Médica.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner

COORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Cláudia Vianna Maurer Morelli

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA MARCELLA BERGAMINI DE BAPTISTA, E ORIENTADO PELO
PROF. DR. CARLOS EDUARDO STEINER.

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2014/11891-6; CNPq

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Ana Paula de Moraes e Oliveira - CRB 8/8985

B229g Baptista, Marcella Bergamini de, 1988-
Gangliosidose GM1 : proposta de estudo em modelo animal utilizando o
Danio rerio / Marcella Bergamini de Baptista. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Carlos Eduardo Steiner.
Coorientador: Cláudia Vianna Maurer Morelli.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Ciências Médicas.

1. Gangliosidose GM1. 2. Zebrafish. 3. Morfolinos. 4. Beta-galactosidase. I.
Steiner, Carlos Eduardo, 1969-. II. Maurer-Morelli, Cláudia Vianna. III.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV.
Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: GM1 gangliosidosis : proposal of an animal model study using
Danio rerio

Palavras-chave em inglês:

Gangliosidosis, GM1

Zebrafish

Morpholinos

Beta-galactosidase

Área de concentração: Genética Médica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Carlos Eduardo Steiner [Orientador]

Andréa Trevas Maciel Guerra

Monica Barbosa de Melo

Chong Ae Kim

Marcelo de Lima Ribeiro

Data de defesa: 25-07-2017

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

NOME DO ALUNO

Orientador PROF. DR. Carlos Eduardo Steiner

Coorientadora PROF(A). DR(A). Cláudia Vianna Maurer Morelli

MEMBROS:

- 1. PROF. DR. CARLOS EDUARDO STEINER**
 - 2. PROF(A). DR(A). ANDRÉA TREVAS MACIEL GUERRA**
 - 3. PROF(A). DR(A). MONICA BARBOSA DE MELO**
 - 4. PROF(A). DR(A). CHONG AE KIM**
 - 5. PROF. DR. MARCELO LIMA RIBEIRO**
-

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora
encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: 25 de julho de 2017

Dedicatória

Dedico esse trabalho aos meus pais Elza e Tarciso que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, que doaram todo o seu amor e carinho, que compraram esse sonho junto comigo, que são meus alicerces nas horas mais difíceis e que sempre estão ao meu lado. Eu jamais conseguiria sem vocês.

Agradecimentos

Aos meus pais, **Elza Bergamini e Tarciso Francisco de Baptista**, por todo o amor, dedicação e por serem os melhores do mundo.

Ao meu marido **André Silva Battagin**, você me faz melhor a cada dia. Muito obrigada por me amar e me fazer amar, por me fazer sorrir, por cuidar de mim, por toda a paciência que tem comigo e por encher a nossa casa com a sua alegria.

Ao **Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner**, meu orientador que me amparou e me guiou durante os últimos anos. Desenvolvi uma admiração imensa pelos seus valores e caráter. Muito obrigada por dividir o seu conhecimento comigo. É um privilégio ser sua aluna.

À **Profª Drª Cláudia Vianna Maurer Morelli**, sua sábia orientação e seu carinho me levaram pela mão em muitos momentos. Agradeço por ser a pessoa incrível que é, por ter me ajudado tanto e em tantos momentos. Seu caráter e sua postura de vida são exemplares e por isso você sempre será o meu grande exemplo.

Aos **Professores Doutores Marcelo Lima Ribeiro, Andréa Trevas Maciel Guerra, Monica Barbosa de Melo e Chong Ae Kim** pelas preciosas sugestões que contribuíram para o aprimoramento desta tese.

Aos meus irmãos **Fernanda Bergamini de Baptista e Leandro Francisco Bergamini de Baptista**, por toda força e amor que me deram a vida inteira.

À minha amada família, **Mirian, Edison, Rita, Giovanna e Ricardo** que estava sempre e incondicionalmente ao meu lado.

Aos meus padrastos, **Jaime e Marisa**, que vieram para ficar e chegaram para nos completar. Somos melhores com vocês.

Aos meus amigos **Francesco De Bon, Sarah Zivkovic e Leona Borgas** os maiores presentes que a Itália me trouxe. Aqueles que não me deixaram desistir. O carinho de vocês fez toda a diferença.

Aos meus incríveis melhores amigos e agora padrinhos, **Israel Oliveira, Fernanda Reis e Juliana Merino** por toda a dedicação e paciência. A amizade de vocês é uma das poucas certezas que tenho na vida.

A todos os colegas de laboratório, que sempre estiveram dispostos a ajudar e ensinar.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Resumo

A gangliosidose GM1 é um distúrbio de armazenamento lisossômico autossômico recessivo raro com alta prevalência no Brasil (1:17 000). A diminuição da atividade da enzima β -galactosidase leva à deposição de gangliosídeos GM1 dentro dos lisossomos. O presente estudo teve como objetivo inibir a atividade do gene *glb1* em *zebrafish* utilizando a técnica do morfolino. Foram utilizados testes de hibridização *in situ* X-gal e *whole-mount* para confirmar a atividade de β -galactosidase em larvas com 72, 96 e 120 hpf que foram previamente micro-injectadas com oligos morfolidos e controle de desacoplamento. Os resultados foram comparados a grupos controles selvagem e *mismatch*. A formação óssea foi avaliada pelo azul de Alcian e testes de alizarina, além de análise comportamental feita pelo teste de toque evocado, sendo os resultados analisados por Kruskal-Wallis. Todos os experimentos mostraram ausência de β -galactosidase no sistema nervoso central e um retorno gradual à expressão gênica normal após 96 hpf. A displasia óssea foi evidente a partir de 96 hpf, assim como a letargia aparente dos animais microinjetados com morfolino, que pode ter ocorrido devido a um comprometimento neurológico juntamente com as malformações fenotípicas avaliadas, compreendendo fronte protusa, extensão diferenciada do saco vitelínico e malformação de cauda. Estes resultados confirmam a funcionalidade do oligo e que o *zebrafish* pode representar um modelo animal viável para o estudo da gangliosidose GM1.

Palavras-chave: Gangliosidose GM1; beta-galactosidase; morfolino; *zebrafish*.

Abstract

GM1 gangliosidosis is a rare autosomal recessive lysosomal storage disorder with high prevalence in Brazil (1:17 000). The decreased enzymatic activity of β -galactosidase leads to GM1 ganglioside deposition inside the lysosomes. The present study aimed to knockdown the *glb1* gene activity in zebrafish using the morpholino technique. X-gal and Whole-mount *in situ* hybridization tests were used to confirm β -galactosidase activity at 72, 96 and 120 hpf larvae that were microinjected with morpholinos oligos, compared to mismatch and wild type control. The bone formation was evaluated by Alcian blue and alizarin tests, and behavioral analysis was performed by the touch-evoked test. Results were analyzed by Kruskal-Wallis. All experiments showed absence of β -galactosidase in the central nervous system and a gradual return to normal gene expression after 96 hpf. Bone dysplasia was evident from 96 hpf, as well as the apparent lethargy of the animals microinjected with morpholino, which may have happened due to a neurological impairment together with the evaluated phenotypic malformations, which included frontal bossing, abnormal yolk extension, and tail malformation. These results confirm the functionality of the oligo and that zebrafish may represent a viable animal model for the study of GM1 gangliosidosis.

Key words: GM1 gangliosidosis; beta-galactosidase; morpholino, zebrafish.

Lista de Ilustrações

Figura 1.	Possíveis consequências resultantes de mutações que afetam uma via metabólica hipotética normal representada pela substância precursora A, produtos intermediários B e C, produto final D e produtos intermediários E a G.	14
Figura 2.	Hidrólise do terminal β -galactosil do gangliosídeo GM1 pela β -galactosidase.	17
Figura 3.	Estrutura química do gangliosídeo GM1.	18
Figura 4.	Aspectos clínicos de uma paciente com gangliosidose GM1 forma infantil	20
Figura 5.	Radiografias da paciente mostrada na figura 3, com gangliosidose GM1 na forma infantil.	21
Figura 6.	Pacientes com diagnóstico de gangliosidose GM1 na forma adulta (A, C, E) e juvenil (B, D, F)	23
Figura 7.	Localização das mutações no gene <i>GLB1</i> . Adaptado de Brunetti-Pierri & Scaglia, 2008.	25
Figura 8.	Estrutura de um oligonucleotídeo morfolino.	30
Figura 9.	Representação do funcionamento de oligonucleotídeos morfolinos para bloqueio da tradução e sítio de <i>splice</i> .	30
Figura 10.	Fluxograma representando a ordem dos experimentos realizados.	37
Figura 11.	Representação esquemática da reação que ocorre durante o teste de X-gal.	39
Figura 12.	Embriões de <i>zebrafish</i> com 30 hpf.	43
Figura 13.	Embriões de <i>zebrafish</i> com 48 hpf microinjetado com 2 ng de morfolino para a região promotora apresentando efeitos <i>off-target</i> .	44
Figura 14.	Embriões de <i>zebrafish</i> com 48 hpf microinjetados com 1,5 ng de morfolino para bloqueio da tradução e mismatch.	45
Figura 15.	Embriões de <i>zebrafish</i> com 48 hpf microinjetados com 1,75 ng de morfolino para bloqueio da tradução e controle mismatch.	46
Figura 16.	Embriões de <i>zebrafish</i> com 48 hpf microinjetados com 5,5 ng de morfolino para a região de sítio de <i>splice</i> e controle mismatch.	47
Figura 17.	Eletroferograma destacando trecho do fragmento que contém o intron 5-6 do gene <i>glb1</i> do <i>zebrafish</i> .	48

Figura 18.	Larvas de <i>zebrafish</i> com 120 hpf coradas pelo método de <i>alcian blue</i> .	49
Figura 19.	Larvas de <i>zebrafish</i> com 120 hpf coradas pelo método de <i>alcian blue</i>	50
Figura 20.	Resultados do teste de X-gal em larvas de <i>zebrafish</i> com 72 e 96 hpf.	52
Figura 21.	Larvas de <i>zebrafish</i> com 120 hpf coradas pelo método de WISH.	53
Figura 22.	Distância percorrida por larvas de <i>zebrafish</i> com 5 dpf com o gene <i>glb1</i> silenciado pela técnica de morfolino e os dois grupos controle durante a análise da atividade locomotora por 60 minutos.	55
Figura 23.	Velocidade das larvas de <i>zebrafish</i> com 5 dpf com o gene <i>glb1</i> silenciado pela técnica de morfolino e dos dois grupos controle durante a análise da atividade locomotora por 60 minutos.	56
Figura 24.	Distância percorrida por larvas de <i>zebrafish</i> com 5 dpf com o gene <i>glb1</i> silenciado pela técnica de morfolino e os dois grupos controle durante a análise da reatividade ao toque.	58
Figura 25.	Velocidade das larvas de <i>zebrafish</i> com 5 dpf com o gene <i>glb1</i> silenciado pela técnica de morfolino e os dois grupos controle durante a análise da reatividade ao toque.	59
Figura 26.	Larvas de <i>zebrafish</i> com 120 hpf durante o teste de reação ao toque.	60
Figura 27.	Atividade específica da enzima β -galactosidase aumenta durante o desenvolvimento embrionário do <i>zebrafish</i>	61

Lista de tabelas e quadros

Tabela 1.	Descrição das três formas clínicas de gangliosidose GM1.	24
Tabela 2.	Distribuição dos experimentos realizados.	44
Tabela 3.	Sequência referência do gene <i>glb1</i> em <i>zebrafish</i> .	48
Tabela 4.	Comparação do tamanho médio das cartilagens dos embriões com 120 hpf.	51
Tabela 5.	Sinais e sintomas descritos em pacientes e modelos animais para a gangliosidose GM1.	68
Quadro 1.	Média $\pm$ SEM para distância percorrida e velocidade das larvas de <i>zebrafish</i> com 5 dpf durante a observação por 60 minutos de cada grupo analisado e valor de p para a comparação entre os três grupos pelo teste de Kruskal-Wallis.	54
Quadro 2.	Média $\pm$ SEM para distância percorrida e velocidade das larvas de <i>zebrafish</i> com 5 dpf durante o teste de reação ao toque de cada grupo analisado e valor de p para a comparação entre os três grupos pelo teste de Kruskal-Wallis.	57

Sumário

1. Introdução	14
1.1 Erros Inatos do Metabolismo	14
1.2 Doenças de Depósito Lisossômico	16
1.3 Gangliosidose GM1	17
1.3.1 Tipo I ou forma infantil	19
1.3.2 Tipo II ou forma juvenil	22
1.3.3 Tipo III ou forma adulta/crônica	22
1.4 Gene <i>GLB1</i>	25
1.5 Modelos animais para gangliosidose GM1	26
2. Objetivos	33
2.1 Objetivo Geral	33
2.2 Objetivos específicos	33
3. Materiais e métodos	34
3.1 Aspectos éticos da pesquisa	34
3.2 Manutenção dos animais	34
3.3 Obtenção de embriões	34
3.4 Morfolino	35
3.5 Confirmação da inserção do íntron com sequenciamento por eletroforese capilar	37
3.6 Avaliação enzimática	38
3.6.1 Teste de X-gal	38
3.6.2 <i>Whole-mount in situ hybridization</i> (WISH)	39
3.7 Teste de <i>alcian blue</i> e alizarin	40

3.8	Avaliação comportamental	41
3.9	Análise estatística	42
4.	Resultados	43
4.1	Análise fenotípica	43
4.2	Confirmação da inserção do íntron com sequenciamento por eletroforese capilar	48
4.3	Teste de <i>alcian blue</i> e alizarin	49
4.4	Avaliação enzimática	52
4.4.1	Teste de X-gal	52
4.4.2	WISH	53
4.5	Avaliação comportamental	54
5.	Discussão	61
6.	Conclusões	69
7.	Referências	70
8.	Anexos	81

1. Introdução

1.1. Erros Inatos do Metabolismo

Os erros inatos do metabolismo (EIM) formam um grupo de doenças genéticas relacionadas a alterações em processos bioquímicos de uma via metabólica conhecida do organismo, sendo a maioria monogênica e de herança autossômica recessiva, em geral com apresentação clínica heterogênea^{1,2}.

A maioria dos EIM se manifesta na faixa etária pediátrica, mas o início dos sintomas pode ocorrer em qualquer idade. O fenótipo de cada uma das doenças é uma consequência da deficiência de proteínas catalíticas ou transportadoras, que pode provocar a ausência de um produto esperado, o acúmulo de substrato da etapa anterior à interrompida ou o surgimento de uma rota metabólica alternativa (Figura 1)^{1,2}.

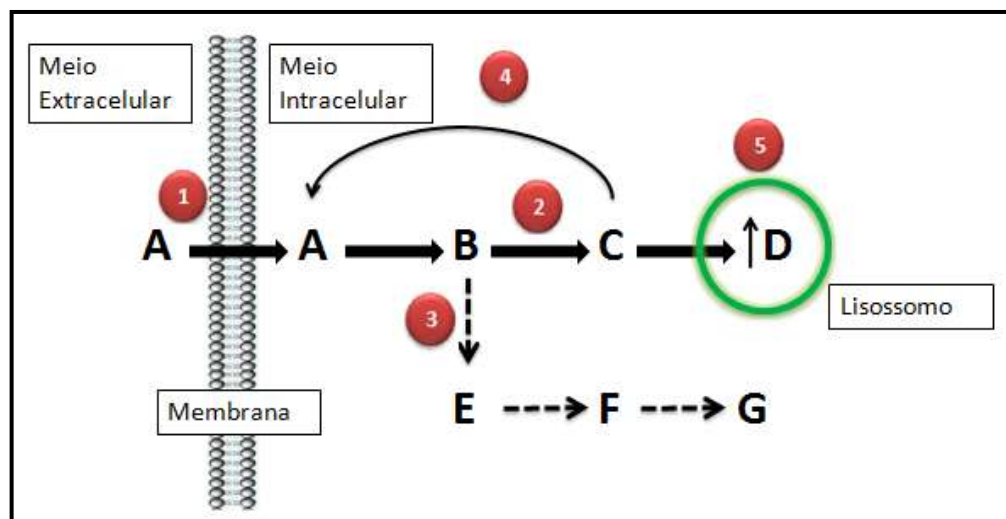


Figura 1: Possíveis consequências resultantes de mutações que afetam uma via metabólica hipotética normal representada pela substância precursora A, produtos intermediários B e C, produto final D e produtos intermediários E a G. **1)** Defeitos em transportadores; **2)** Defeito enzimático ocasionando o acúmulo de substrato e(ou) deficiência dos produtos intermediários e finais; **3)** Surgimento de rota metabólica secundária, geralmente resultando em produtos alternativos tóxicos; **4)** Inibição deficiente do produto A por *feedback* negativo devido a ausência do subproduto C. **5)** Ausência ou diminuição da atividade de enzimas lisossômicas e acúmulo do produto D que pode ocasionar posterior ruptura da membrana dos lisossomos. (Adaptado de Clarke, 2006).

Até o momento mais de 550 doenças metabólicas foram descritas. Se consideradas de maneira isolada, a incidência de cada uma delas é rara, como por exemplo, a homocistinúria (1:200.000 a 350.000). Porém, em conjunto, a frequência dos distúrbios se torna mais expressiva (1:1.000)³.

Tratando-se de doenças distintas, os EIM têm diversas classificações e podem ser agrupados de acordo com suas características fisiopatológicas e fenótipo clínico⁴.

- Grupo I: erros inatos do metabolismo intermediário que provocam o acúmulo progressivo de produtos tóxicos.
- Grupo II: deficiência na produção ou utilização de energia.
- Grupo III: distúrbios de síntese ou catabolismo de moléculas complexas.

Todas as doenças que compõe o grupo I (aminoacidopatias, acidúrias orgânicas, defeitos congênitos do ciclo da ureia, intolerância a açúcares, erros inatos do metabolismo de metais e porfirias) não interferem no desenvolvimento embrio-fetal e apresentam sintomas de intoxicação que podem ser agudos (vômito, coma, falência hepática, complicações tromboembólicas) ou crônicos (baixo ganho ponderal, atraso no desenvolvimento neurológico, luxação de cristalino e cardiopatia). De um modo geral, os sinais clínicos se expressam tardiamente, mas são intermitentes. Em sua maioria, as doenças desse grupo são tratáveis por meio da remoção emergencial e imediata da toxina, por esse motivo a terapia nutricional é a base do tratamento, mas também podem ser utilizados medicamentos que auxiliam na desintoxicação além de doses farmacológicas de vitaminas⁴.

As condições que pertencem ao grupo II (acidemias lácticas, hiperinsulinemia, distúrbios de oxidação dos ácidos graxos, da glicólise, do metabolismo de glicogênio e da gliconeogênese) podem ser divididas em doenças mitocondriais e citoplasmáticas, sendo os defeitos mitocondriais mais graves e normalmente sem tratamento. Geralmente interferem no desenvolvimento embrio-fetal e originam dismorfismos, displasia e malformações^{4,5}.

Em contrapartida, as doenças que pertencem ao grupo III apresentam sintomas permanentes, progressivos, independente de eventos intercorrentes e não relacionados com a alimentação. Várias estratégias de tratamento através de transplante de células ou de órgãos foram testadas, algumas bem sucedidas, mas muitos estão em fase experimental. Dentro desse grupo encontram-se os erros inatos de síntese do colesterol, alterações de processamento e tráfico intracelular, distúrbios peroxissômicos e as doenças de depósito lisossômico (DDL)⁴.

1.2. Doenças de depósito lisossômico

As DDL são um grupo de condições resultantes de mutações genéticas herdadas que afetam genes codificadores de hidrolases lisossômicas, proteínas de membrana ou ativadoras, alterando dessa maneira a homeostase dos lisossomos. A principal característica desse grupo de doenças é o acúmulo progressivo de macromoléculas não digeridas^{6,7}.

A causa da patogênese varia de acordo com algumas características da enzima lisossômica alterada, entre elas a sua atividade residual, a caracterização bioquímica das macromoléculas armazenadas e também o tipo celular em que esse acúmulo ocorre. Esses fatores influenciam diretamente a idade de início dos sintomas e o fenótipo apresentado pelos pacientes⁷.

Quase dois terços de todos os pacientes com DDL apresentam pelo menos algum envolvimento neuronal⁸, que tem início com inflamação e posterior neurodegeneração em uma região específica do cérebro antes de todo o sistema nervoso central ser afetado^{7,9,10}. Essas alterações iniciais podem ser, por exemplo, distrofia neuroaxonal, meganeurite ou dendritogênese ectópica^{11,12,13}.

A apresentação clínica é heterogênea, principalmente porque os sintomas neurológicos e sistêmicos começam em momentos diversos e progridem em ritmos diferentes, mas, de um modo geral, problemas na visão estão entre os sinais neurológicos mais precoces⁷. Com exceção de casos em que ocorre deposição precoce em ossos e cartilagens, a maioria dos pacientes afetados por DDL são normais ao nascimento. Geralmente, os sintomas causados pela neurodegeneração têm início durante a infância, mas o início da sintomatologia pode ocorrer durante toda a vida adulta⁶.

Conforme a progressão da doença, em casos em que a sintomatologia se iniciou durante a infância, os pacientes podem apresentar convulsões, perda da audição, deficiência intelectual e regressão neuromotora. Para aqueles que têm início durante a fase adulta os sintomas mais comuns são depressão, demência e psicose somados a outros déficits neurológicos, como atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, crises mioclônicas, ataxia ou acidente vascular encefálico^{14,15}.

Mais de 50 tipos diferentes de DDL foram descritos e assim como os EIM, de forma isolada são consideradas raras, mas com uma expressividade considerável quando sua incidência é avaliada coletivamente (1:5.000 nascidos vivos)^{6,7}. Além disso, algumas doenças

pertencentes a esse grupo podem ser consideradas raras em todo o mundo, porém apresentam uma frequência mais elevada em lugares específicos. Isso acontece com a gangliosidose GM1, descrita como pouco frequente na maioria dos países (1:100.000 a 200.000 nascidos vivos)¹⁶, mas com uma incidência mais expressiva no Brasil (1:13.317)¹⁷.

1.3. Gangliosidose GM1

Gangliosidose GM1 é uma doença neurodegenerativa, autossômica recessiva, em que o fenótipo apresentado pelos pacientes ocorre devido à deficiência da enzima lisossômica β -galactosidase (E.C.3.2.1.23; β -gal), cuja função principal é realizar a hidrólise do terminal β -galactosil de glicoproteínas, esfingolípídeos e glicosaminoglicanos, especialmente o gangliosídeo GM1¹⁸ (Figura 2).

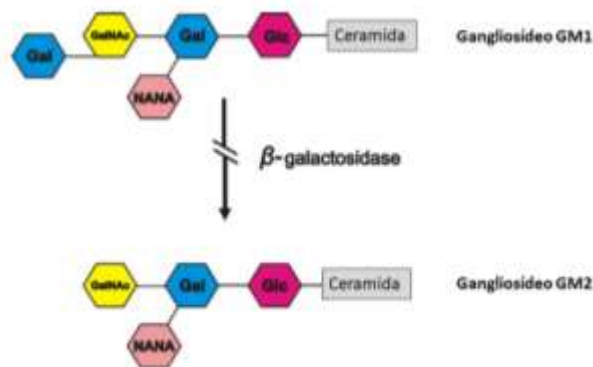


Figura 2: Hidrólise do terminal β -galactosil do gangliosídeo GM1 pela β -galactosidase. Gal: galactose, GalNAc: N-acetilgalactosamina, Glc: glicose, NANA: ácido N-acetilneuramínico. Adaptado de Brunetti-Pierri & Scaglia, 2008¹⁶.

O gangliosídeo GM1 é um glicoesfingolípídeo, presente na membrana celular de todos os tecidos dos vertebrados¹⁹, composto por uma molécula de ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico) unida a quatro oligossacarídeos neutros (duas galactoses, uma N-acetilgalactosamina e uma glicose) através de uma ligação α -glicosídica (Figura 3)²⁰.

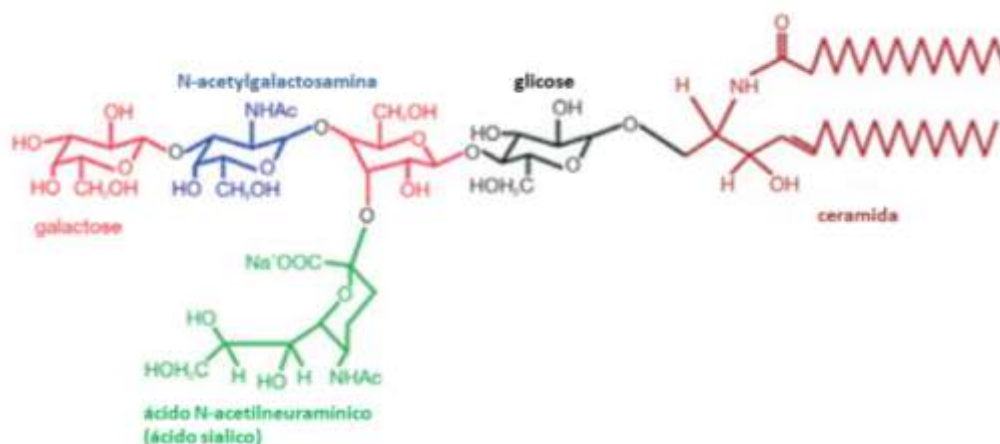


Figura 3: Estrutura química do gangliosídeo GM1. Adaptado de Mocchetti, 2005²⁰.

O crescimento e a maturação do sistema nervoso central são influenciados por todos os gangliosídeos, uma vez que sua concentração e localização sofrem importantes mudanças durante o desenvolvimento cerebral²¹, além disso, o cérebro é o tecido que contém a maior quantidade de gangliosídeos, um a dois gramas por quilo e estima-se que de 10 a 20% desse total seja composto pelo GM1²².

Devido a estas características, tais moléculas podem ser usadas individualmente como marcadoras dos estágios de diferenciação celular, sendo o GM1 um dos mais importantes relacionados à mielinização²³. Outras funções associadas a esse gangliosídeo e revistas por Aureli et al. (2016)²² incluem a participação na sinaptogênese e na transmissão sináptica, podendo funcionar como receptor, interagindo com outras células, com a matriz extracelular ou com substâncias exógenas modulando a resposta a fatores neurotróficos e a atividade de transportadores de membrana, agindo também no bloqueio da excitotoxicidade.

A biossíntese do GM1 é realizada por transferases ligadas a membrana. Este gangliosídeo é transportado da membrana para o lisossomo, onde é degradado de maneira gradual pela hidrolase β -galactosidase. Mutações no gene *GLB1*, codificador da enzima, resultam na diminuição da sua atividade e consequentemente no acúmulo intralisossômico de gangliosídeo GM1^{16,18}.

A gangliosidose GM1 é classificada em três formas clínicas de acordo com a idade de manifestação dos sintomas, atividade enzimática residual e gravidade do quadro clínico.

1.3.1. Tipo I ou forma infantil (MIM# 230500)

Os sinais e sintomas clínicos têm início até o sexto mês de vida e a doença evolui de maneira rápida e progressiva. Os pacientes podem apresentar falta de apetite e dificuldade de sucção que levam a um ganho de peso abaixo do esperado durante o período neonatal¹⁸.

A maioria dos casos inicia-se com atraso do desenvolvimento evoluindo para um maior comprometimento neurológico apresentando sintomas extrapiramidais (disartria, disfagia, tremores nas mãos, rigidez de braços e pernas com consequente dificuldade para andar). A hipotonia muscular generalizada durante o estágio inicial da doença muda gradualmente para rigidez e espasticidade, associada a crises convulsivas frequentes. Mancha vermelho-cereja na mácula assim como a opacificação de córnea estão presentes em quase todos os casos, em estágios mais avançados o paciente pode apresentar atrofia ótica e a retina se torna edemaciada^{18,24,25,26}.

Em casos típicos, a displasia esquelética generalizada é evidente e progressiva, assim como as seguintes alterações dismórficas: pele grossa e áspera, abaulamento frontal, ponte nasal baixa, orelhas de implantação baixa, aumento da distância entre o nariz e o lábio superior, hirsutismo na fronte e no pescoço, hipertrofia gengival, macroglossia, cifoescoliose dorso lombar, mãos largas com dedos curtos, musculatura interossea atrofica e articulações rígidas com contratura generalizada (Figuras 4 e 5)¹⁸. O paciente torna-se vegetativo e, geralmente, morre entre um e dois anos de idade^{16,18}.

A atividade da enzima β -galactosidase em cultura de fibroblastos é muito reduzida, sendo menor que 1%²⁷. Apesar disso, essas alterações físicas não estão sempre presentes e muitos pacientes apresentam-se com doença neurodegenerativa sem alterações físicas marcantes, consequentemente a forma infantil da gangliosidose GM1 pode ser subdiagnosticada muitas vezes^{18,28}.

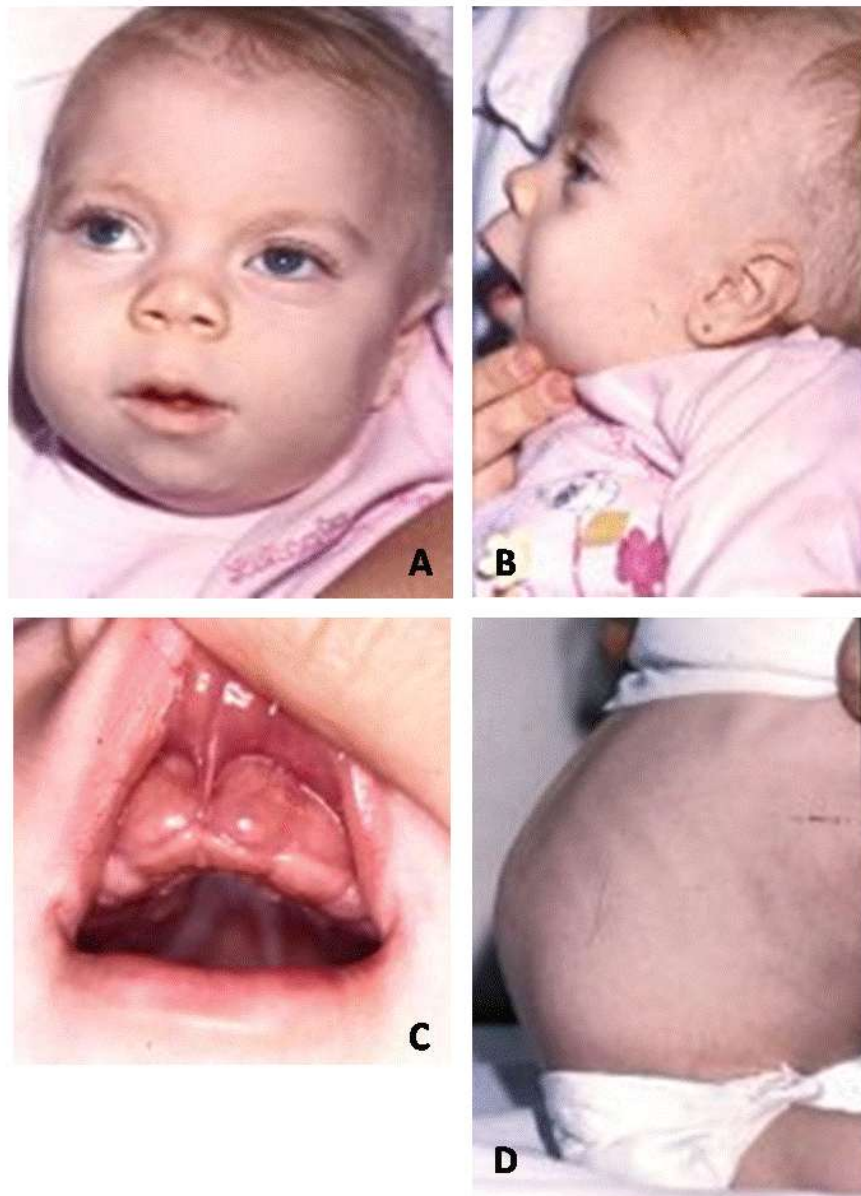


Figura 4: Aspectos clínicos de uma paciente com gangliosidose GM1 forma infantil: face infiltrada (A, B), hipertrofia gengival (C) e cifose (D). Fonte: Kannebley (2015)²⁸.



Figura 5: Radiografias da paciente mostrada na Figura 4, com gangliosidose GM1 na forma infantil: hepatomegalia (seta) (A), platiespondilia com encunhamento vertebral especialmente de L1 (seta) (B), alargamento de metacarpos (seta) (C) e alargamento metafisário em ossos longos dos membros inferiores (seta) (D). Fonte: Kannebley (2015)²⁸.

1.3.2. Tipo II ou forma juvenil (MIM# 230600)

As manifestações clínicas nesses pacientes são uniformes e têm início relativamente precoce, entre sete meses e três anos de idade, com expressões fenotípicas heterogêneas e progressão lenta^{18,24}. As características principais são o atraso no desenvolvimento do sistema motor e cognitivo, lipidose neuronal, dismorfismos esqueléticos menos graves que na forma infantil e visceromegalia (Figura 6). A mancha vermelho-cereja na mácula não é frequente¹⁶. Os problemas locomotores iniciais podem evoluir para fraqueza muscular e letargia, comumente levando o paciente a desenvolver broncopneumonias²⁹. Nesse tipo a atividade residual da enzima está entre 0,3 a 4,8%¹⁶.

1.3.3. Tipo III ou forma adulta/crônica (MIM# 230650)

É um fenótipo caracterizado por sinais clínicos mais brandos em que a distonia é a principal manifestação neurológica^{18,29,30}. Com relação aos sintomas iniciais tanto deformidades esqueléticas quanto sintomas neurológicos são, individualmente, frequentes (Figura 6). Apesar disso, uma combinação de ambos foi vista, ao longo do tempo, em todos os casos descritos por Kannebley et al., 2015²⁸.

Geralmente, o início dos sintomas é tardio (entre três e 30 anos) e a idade de início é variável mesmo entre irmãos, mas na maioria dos pacientes a sintomatologia começou antes dos 20 anos^{18,28}. A apresentação clínica é muito variável entre os indivíduos, mas de um modo geral dificuldades para andar e falar são os primeiros sinais na maioria dos casos.

As características que podem ser observadas mais frequentemente incluem disfunção cerebelar, distonia, baixa estatura, deformidades vertebrais leves²⁹, sintomas extrapiramidais, deposição progressiva de glicosíngolípídeos nos núcleos da base e alteração de substância branca, bem como atividade enzimática próxima a 9% da atividade normal¹⁶. A maculopatia vermelho-cereja não costuma ser observada, mas a opacificação de córnea foi descrita em alguns pacientes^{18,28}.



Figura 6: Pacientes com diagnóstico de gangliosidose GM1 na forma adulta (A, C, E) e juvenil (B, D, F). Em ambos houve diagnóstico prévio de doença de Morquio tipo B devido a displasia óssea com tronco curto, caracterizada por platiespondialia importante com deformidade vertebral e encunhamento de L1 (C, D), além de comprometimento acetabular (E, F). Fonte: Kannebley (2015)²⁸.

Embora descritas como tipos distintos, a exemplo de diversas outras doenças genéticas decorrentes de deficiências enzimáticas, mais provavelmente representam um contínuo de apresentação clínica indo do acometimento grave ao leve. O resumo das principais características clínicas das três formas de gangliosidose GM1 é apresentado na Tabela 1.

Tabela 1: Descrição das três formas clínicas de gangliosidose GM1.

Tipo	Idade de início	Atividade enzimática residual	Gravidade e características clínicas
1 (infantil)	0 – 6 meses	0,07-1,3 %	+++ Hipotonia, disfagia, convulsões; Displasia esquelética generalizada; Morte antes dos 3 anos de vida
2 (juvenil)	7 meses - 3 anos	0,3-4,8 %	++ Ataxia e alterações de movimento; Displasia esquelética variável; Sobrevida mais longa
3 (adulta or crônica)	> 3 anos	~ 9 %	+ Disartria, disfagia, convulsões; Displasia esquelética localizada; Sobrevida mais longa

Atualmente não existem tratamentos efetivos para a gangliosidose GM1, apenas terapias de apoio podem ser oferecidas. Modelos animais são estudados para um melhor entendimento das bases molecular e celular da patogênese, além de poderem ser utilizados para o desenvolvimento e teste de novos tratamentos e medicamentos, sendo fundamentais na determinação da segurança, eficácia e mecanismos de ação das drogas antes de usadas em humanos³¹.

1.4 Gene *GLB1*

O gene codificador da enzima β -gal é o *GLB1*, mapeado no braço curto do cromossomo 3 (3p21.33) com 16 éxons, 647 aminoácidos e abrangendo cerca de 62,5 kb³⁰.

Em revisão da literatura especializada, foram descritas mais de 165 mutações no gene *GLB1*³², sendo a maioria *missense/nonsense*, seguidas por mutações em sítios de *splicing*, enquanto as menos frequentes são as inserções e deleções³³.

A localização das mutações *missense/nonsense* principalmente nos exons 2, 6 e 15 (Figura 7) sugere possíveis funções catalíticas ou regulatórias nas porções proteicas codificadas por essas regiões¹⁶.

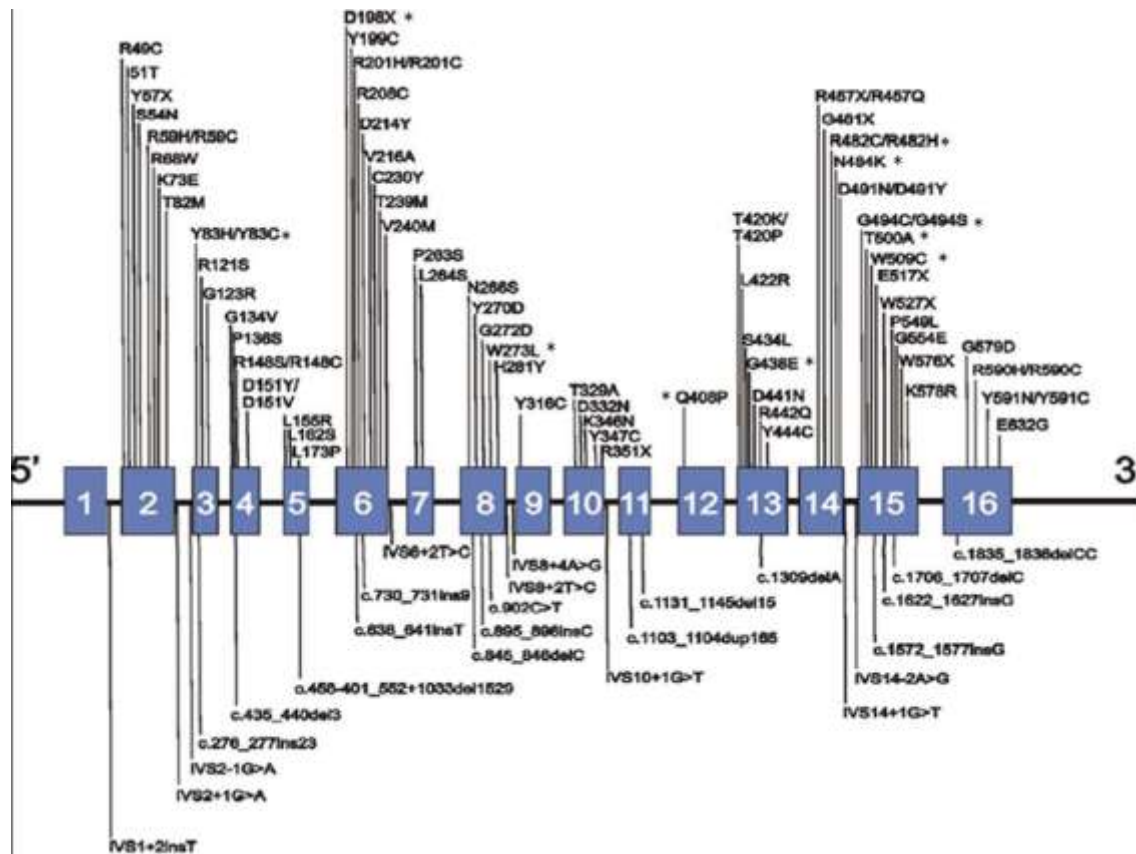


Figura 7. Localização das mutações no gene *GLB1*. Adaptado de Brunetti-Pierri & Scaglia, 2008.

* Mutações associadas à doença de Morquio B.

O conhecimento sobre os efeitos das alterações na função e biossíntese da proteína β -gal ainda é limitado²⁷, dificultando uma clara relação genótipo/fenótipo. Outro fator que dificulta o esclarecimento dessa relação é a heterogeneidade molecular, a exemplo de um

caso prévio de um paciente homozigoto para a mutação p.Arg201His sem envolvimento neurológico foi classificado com doença de Morquio B, outros heterozigotos com essa mutação foram associados com a forma juvenil ou adulta da gangliosidose GM1^{27,34}.

A β -gal é codificada como uma enzima precursora de 76 kDa, que é primeiramente modificada na forma glicosilada de 85 kDa e processada na forma madura de 64 kDa dentro dos lisossomos³⁵. A maturação da precursora da β -gal exige a associação com a proteína protetora/catepsina A (PPCA)³⁰. Quando ativada, a enzima madura forma um complexo de alto peso molecular com a PPCA, a neuraminidase (NEU1) e a N-acetil galactosamina-6-sulfato (GALNS) nos lisossomos²⁹. Nesse caso a PPCA é essencial para o transporte intracelular e para a estabilidade intralisossômica da β -gal e NEU1^{29,36}. O complexo enzimático realiza a degradação de gangliosídeos GM1 e GA1, glicoesfingolipídeos, glicosaminoglicanos, glicopeptídeos e esfingolipídeos dentro dos lisossomos³⁶.

A deficiência de β -gal leva também a um outro quadro clínico descrito como doença de Morquio B, com herança autossômica recessiva e caracterizada por disostose múltipla com alterações ósseas típicas, retardo no crescimento, opacificação de córneas, dano na função cardíaca e, diferente da gangliosidose GM1, é descrita tradicionalmente como não apresentando comprometimento cognitivo. Esses sintomas aparecem devido ao acúmulo de *keratan* e oligossacarídeos nos ossos, cartilagens e córnea. Geralmente os pacientes excretam grande quantidade desses produtos na urina^{27,37,38}. Porém, atualmente, existem controvérsias se a condição clínica rotulada como "Morquio B" representa uma entidade específica, uma vez que tem se observado que alguns indivíduos evoluem com comprometimento neurológico e passam a apresentar os sinais e sintomas da gangliosidose GM1 nas formas tardias^{16,27,28,39}.

1.5. Modelos animais para gangliosidose GM1

A gangliosidose GM1 foi descrita inicialmente em humanos^{40,41,42}, mas também foi registrada nas seguintes espécies animais: gatos⁴³, cachorros⁴⁴, gado bovino⁴⁵, ovelhas^{46,47}, emus⁴⁸ e no urso negro americano⁴⁹. Todos esses animais foram cuidadosamente estudados e alguns utilizados para terapia experimental, com exceção dos emus e do urso negro.

Os gatos descritos por Blakemore (1972)⁴³ apresentaram abaulamento frontal, displasia esquelética e ataxia, sendo o modelo espontâneo mais completo até o momento por apresentar comprometimento ósseo e neurológico. Nos cachorros os sintomas descritos

foram: disfunção motora progressiva e hepatoesplenomegalia⁴⁴. Nos demais animais os principais sintomas descritos eram neurológicos, sendo eles ataxia e tremores (emu e urso negro), além de fraqueza generalizada nas ovelhas e no gado bovino, sendo que esse último apresentou também edema de retina^{45,46,47,48,49}.

Apesar disso, a disponibilidade de um modelo animal pequeno que pudesse ser geneticamente manipulado em laboratório facilitaria os estudos com relação à patologia e à terapia⁵⁰. Com este objetivo, Hahn e colaboradores (1997)⁵⁰ geraram, utilizando a tecnologia de recombinação homóloga, camundongos com diminuição na expressão de β -galactosidase. Para isso, o gene *Glb1* foi inativado pela introdução de uma sequência do gene da neomicina na parte central do exon 6, o que garantiu a inativação completa, mesmo se uma versão truncada da enzima fosse gerada. Os camundongos com a alteração genética apresentaram uma redução da atividade enzimática em todos os tecidos estudados e ausência de RNA mensageiro do gene *Glb1*. Mesmo após a terceira semana de vida não era possível identificar a degradação de gangliosídeos GM1, sendo sua deposição comprovada no cérebro, cerebelo, tronco encefálico, medula espinhal e gânglios da raiz dorsal. Porém o acúmulo de oligossacarídeos no fígado foi mínimo e o órgão não apresentava nenhuma alteração estrutural ou de tamanho. Da mesma maneira os animais não apresentaram nenhum sintoma relacionado a problemas ósseos. Esses resultados diferem dos pacientes com o tipo I da doença e, segundo esses autores, uma possível explicação para isso é o aumento da expressão da enzima galactosilceramidase que poderia compensar a ausência de β -galactosidase em camundongos.

Apesar disso, o comprometimento do sistema nervoso central é a característica mais predominante nos camundongos e é consistente com aquele apresentado pelos pacientes. O acúmulo de gangliosídeos GM1 ocorreu de maneira rápida e distribuída, aparentemente, desde o nascimento, com quase todos os neurônios sendo afetados. Após os cinco meses de idade os animais começaram a apresentar problemas neurológicos evidentes incluindo tremor, ataxia e marcha anormal. Sendo assim, este modelo mimetiza os aspectos mais fundamentais das alterações neuropatológicas e neuroquímicas da doença humana⁵⁰.

Apesar de mamíferos, como ratos e camundongos, serem tradicionalmente utilizados em pesquisas, em casos como o da gangliosidose GM1, em que o modelo mais acessível não permite a observação de todos os aspectos clínicos da doença outros modelos animais podem ser avaliados. Nesse sentido, o *Danio rerio* (zebrafish) possui muitas vantagens para

manipulações genéticas e pode se constituir uma ferramenta importante e promissora para o estudo de doenças lisossômicas de depósito.

Uma das principais vantagens do *zebrafish* é possuir uma grande parte dos órgãos e sistemas similares ao dos humanos, além da fecundação ser externa e todo o desenvolvimento ocorrer independente do corpo materno. Os peixes são transparentes durante as fases iniciais e, quando há manipulação genética no embrião, os fenótipos tendem a manifestar-se durante o estágio larval (até cinco dias após a fertilização) o que torna possível uma avaliação *in vivo* não invasiva. Três meses após a fecundação os animais começam a se reproduzir e um único casal pode gerar até 200 embriões por semana, permitindo uma amostra estatisticamente relevante por um baixo custo^{31,51,52}.

O genoma completo do *zebrafish* está disponível em bancos de dados, sendo que 70% dos genes são semelhantes ao genoma humano⁵². Importante ressaltar que a fisiologia do *Danio rerio* é muito semelhante a dos mamíferos, sendo identificados ortólogos para todos os neuropeptídeos conhecidos⁵³. Essas características permitem a identificação fácil e rápida dos genes ortólogos àqueles que estão relacionados aos EIM^{31,51}.

A utilização do *zebrafish* como modelo animal para EIM, apesar de estar apenas no início, apresenta-se como uma promessa para um entendimento mais profundo dos mecanismos patológicos, início e progressão dessas doenças³¹.

Algumas técnicas para o silenciamento gênico estão disponíveis, sendo as principais TALEN (*transcription activator-like effector nucleases*), CRISPR/Cas9 (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) e morfolino. As duas primeiras técnicas são utilizadas com o objetivo de inativar o gene alvo por meio de uma inserção ou deleção no DNA alvo. Os TALENs consistem na nuclease *Fok I* conjugada com repetições TALE de 34 aminoácidos que reconhecem os nucleotídeos. O CRISPR/Cas9 é um sistema que combina uma fita de RNA guia (gRNA) e uma endonuclease (Cas9), capaz de clivar a dupla fita de DNA em região específica por meio do reconhecimento de uma sequência justaposta ao alvo conhecida como PAM (*protospacer adjacent motif*)^{54,55}.

Até o momento, pelo menos seis DDL foram reproduzidas em *Danio rerio*. O modelo mutante para a lipofuscinose ceróide neuronal 2 (CLN2) causada pela deficiência de tripeptidil peptidase 1 (TPP1) foi gerado por meio da técnica de *N-ethyl-N-nitrosourea mutagenesis* e foi o primeiro descrito para uma DDL. Os animais apresentaram neurodegeneração de início precoce, crises epiléticas, problemas na visão e sobrevida

reduzida (até sete dias pós-fertilização). Além de refletirem a condição humana, foi possível identificar nesses peixes a proliferação neuronal deteriorada como um potencial mecanismo patogênico⁵⁶.

Utilizando a mesma técnica, Zancan e colaboradores (2015)⁵⁷ caracterizaram um modelo mutante para o tipo I da doença de Gaucher em que foi possível comprovar uma nova ligação entre os mecanismos que levam à malformação óssea e à perda da função do gene *gba1*. De acordo com as observações, a deficiência na atividade da glucocerebrosidase desencadeia uma desregulação precoce da atividade da via Wnt canônica, que desempenha um papel crucial na homeostase óssea. Assim, especularam que a manipulação dessa via pode complementar as terapias com enzima de reposição, de redução de substrato, e até mesmo a abordagem com chaperonas moleculares, descrita como promissora.

Somados aos modelos mutantes, vários foram desenvolvidos para DDL em *zebrafish* por meio da técnica de Morfolino (MO), que permite a redução temporária da expressão dos genes relacionados às doenças³¹. A técnica de MO foi descrita por Heasman et al. (2000)⁵⁸ e é bastante empregada em *Danio rerio*. De maneira resumida, MO são oligonucleotídeos sintetizados artificialmente que utilizam anéis morfolinos para substituir a ribose do ácido nucleico (Figura 8). Essa substituição com estruturas análogas permite que essa molécula seja resistente a nucleases. Utilizando um morfolino antisense para a sequência da região 5'UTR a tradução seria bloqueada, enquanto morfolinos que são complementares a uma das regiões de sítio de *splice* podem interromper o *splicing* normal do RNA mensageiro no núcleo (Figura 9), porém para ambos os casos, o silenciamento ou redução da expressão gênica é temporário, com uma duração de aproximadamente cinco dias pós fertilização (dpf)^{59,60}.

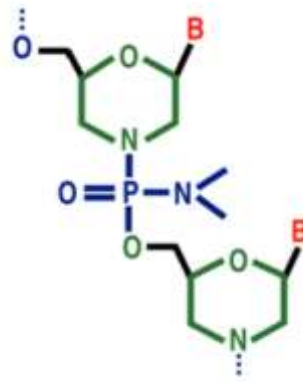


Figura 8: Estrutura de um oligonucleotídeo morfolino. B: bases nitrogenadas (adenina, citosina, guanina, uracila). Adaptado de Probe (Morpholino).

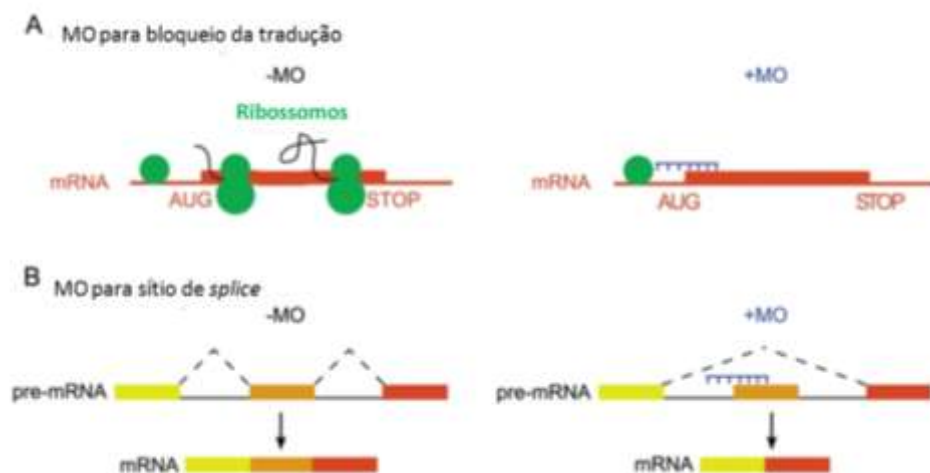


Figura 9: Representação do funcionamento de oligonucleotídeos morfolinos para bloqueio da tradução e sítio de *splice*. **A:** MO para bloqueio da tradução. Na ausência de MO (-MO), os ribossomos leem a sequência 5'UTR e a tradução do RNA mensageiro (mRNA) se inicia no códon AUG. Se um MO hibridizar nessa região (+MO) impede a leitura do mRNA pelo ribossomo. **B:** MO para sítio de *splice*: um MO hibridiza no pré-mRNA em uma junção intron-exon e consequentemente impede a retirada correta dos introns e o éxon correspondente não faz parte do mRNA. Adaptado de Hardy et al. (2010)⁶¹.

Chitramuthu et al. (2010)⁶², Laird et al.(2010)⁶³ e Follo et al. (2013)⁶⁴ utilizaram essa técnica para a avaliação de CLN10 e CLN11 (ceroidolipofuscinose neuronal 10 e 11, respectivamente), para isso MOs para os genes *ctsd* (CLN10) e *pgrna* (CLN11) foram microinjetados em embriões de *zebrafish*. Em todas as pesquisas foi possível comprovar a redução da expressão gênica e observar um fenótipo semelhante àquele desenvolvido pelos

pacientes. Apesar de os modelos não terem sido validados eles certamente são uma ferramenta com a qual é possível compreender a função dessas proteínas durante o desenvolvimento e, consequentemente, os mecanismos da patogênese³¹.

Moro e colaboradores (2010)⁶⁵ comprovaram que a redução da atividade de iduronato 2-sulfatase, enzima lisossômica responsável pelo primeiro estágio do catabolismo dos glicosaminoglicanos dermatan e heparan⁶⁶, responsável por vários processos fundamentais para o início do desenvolvimento, incluindo a correta migração e diferenciação das células da crista neural em crondoblastos, células que formam a matriz da cartilagem e diferenciam-se em condrócitos. Em testes realizados com a aplicação da enzima recombinante idursulfase (Elapraxe®) foi possível recuperar parcialmente as alterações de crânio e face. Esses achados sugerem que o *zebrafish* pode representar um modelo animal válido, em que é possível avaliar os eventos iniciais da patogênese que ocorrem na mucopolissacaridose tipo II⁶⁵.

Outra doença estudada em *zebrafish* com a técnica de MO foi a mucopolidose tipo II. Flanagan-Steet e colaboradores (2009)⁶⁷ silenciaram o gene codificador da GlcNAc-1-fosfotranferase (*gnptab*) e observaram um fenótipo semelhante ao de humanos. O gene estava expresso entre 24 e 120 horas pós-fertilização (hpf) e os peixes desenvolveram deformações oculares, otólitos irregulares, malformação de cartilagem e diminuição de mandíbula, arcos occipitais, raios branquiais e cápsulas auditivas. Esses resultados demonstram que a diferenciação de condrócitos alterada pode ser a responsável pelos defeitos observados nos pacientes com Mucopolidose tipo II.

Por fim, Schwend et al., 2011⁶⁸ comprovaram que a proteína npc1 em *zebrafish* é 60% idêntica à dos humanos e caracterizaram a doença de Niemann-Pick C neste modelo animal. A microinjeção de MO para o gene *npc1* provocou atraso nas divisões celulares entre 4 e 10 hpf, seguido por um acúmulo de grânulos de colesterol consistente com a patogênese dos pacientes e causando morte antes das 48 hpf. A expressão de npc1 é constante nos animais a partir da somatogênese, ficando mais forte no SNC com 24 hpf. Esse fenótipo foi parcialmente resgatado pelo tratamento com pregninolona, um derivado de colesterol e precursor de hormônios esteroides, provando ser parcialmente responsável pelo quadro clínico dos pacientes.

Considerando os achados citados acima pode-se supor que as enzimas relacionadas às DDL são fundamentais para o desenvolvimento normal do *zebrafish*, o que permite a

exploração das bases fisiopatológicas dessas doenças a partir da primeira divisão celular e pode-se concluir, portanto, que o *Danio rerio* é um modelo animal válido para DDL.

Em *zebrafish* o gene *glb1* não está duplicado, localiza-se no cromossomo 1, com 16 exons e 651 aminoácidos⁶⁹. Assim como em humanos o gene é codificador da enzima β -galactosidase. Apesar disso, até o momento, não existem pesquisas em que o gene *glb1* do *zebrafish* tenha sido silenciado. Por se tratar de uma primeira análise fenotípica em *Danio rerio* a técnica escolhida para a realização deste trabalho foi a de morfolino.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Caracterizar o *zebrafish* como modelo animal para estudos funcionais do gene *glb1*.

2.2. Objetivos específicos

Silenciar a expressão do gene *glb1* por meio da técnica de morfolino.

Analisar o fenótipo obtido utilizando as técnicas de *whole-mount in situ hybridization*, coloração para cartilagens e ossos, bem como realizar análises comportamentais.

3. Materiais e métodos

3.1. Aspectos éticos da pesquisa

O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biologia/Unicamp sob o número 3092-1 e 3092-1A (Anexos).

3.2. Manutenção dos animais

As condições de manutenção dos aquários foram de acordo com Westerfield (2000)⁷⁰ e com o *National Human Genome Research Institute - National Institutes of Health Animal Study Proposal (NIH manual, proposal G-01-3)*, como descrita resumidamente a seguir: água decolorada mantida em temperatura constante de 26°C e qualidade determinada por pH 6,8. Alcalinidade: 50 – 100 mg/l de CaCO₃, Amônia menor que 0,02 mg/L e Nitrito menor que 0,1 mg/L. Filtragens do ambiente: a limpeza foi realizada por troca semanal do escoamento de 1/3 da água total do aquário e as paredes higienizadas com esponja semanalmente. Condições de iluminação: 14 horas de luz e dez horas de escuro controlada por temporizador. Alimentação: foi realizada duas vezes ao dia durante o período de luz com alimento em flocos (Tetramin®) e complementação com artêmias para os adultos.

3.3. Obtenção de embriões

A obtenção dos embriões foi por meio de acasalamento natural. Resumidamente: no final da tarde anterior à microinjeção um grupo de 15 animais adultos (machos e fêmeas) foi mantido em criadeira de acasalamento desenvolvida acondicionada em um aquário com as mesmas condições de filtragem, iluminação e qualidade da água descritas no item 3.2. No início do período de luz, os ovos fertilizados foram coletados para a microinjeção.

3.4. Morfolinos (MO)

Os MO foram desenhados para bloqueio da tradução do gene *glb1* (5'-ACTAGTCCGACAACGGGAGCCAT-3') e para uma região de sítio de *splice* (5'-TATATAACCCGTCTTACCTGCACGGT-3'), como controle dos experimentos foram utilizados MOs *mismatch* com cinco bases nitrogenadas diferentes que impedem o anelamento do MO em qualquer outra região do genoma (5'-AaTAGTaCGAaAACGGcAGCaAT-3' para bloqueio de tradução e 5'-TATATAAaCGTaTTAaCTGaACGcT-3', para sítio de *splice*). Todos os oligonucleotídeos foram desenvolvidos pela *GeneTools* (Philomath, OR, USA). As soluções MO *stock* foram ressuspendidas em DNAase/RNase *free water*.

O morfolino *mismatch* foi utilizado como um controle microinjetado em que não há anelamento do mesmo em nenhuma região do genoma, mas é possível fazer a avaliação da toxicidade da molécula nos embriões, o que facilita a avaliação dos efeitos adversos que não são provocados pelo silenciamento do gene alvo (*off target*).

Antes da microinjeção foi preciso definir a dose a ser microinjetada e com base na literatura especializada iniciaram-se os experimentos com 2 ng de morfolino adicionado à seguinte solução⁷⁰:

- 1 µL de Phenol Red (Sigma-Aldrich)
- 1 µL de Danieau solution [58 mM de NaCl; 0,7 mM de KCl; 0,4 mM de MgSO₄; 0,6 mM Ca(NO₃)₂; 5,0 mM HEPES; pH 7.6 (Sigma-Aldrich)]
- 2,5 µL de morfolino (Gene Tools, LLC)
- 5,5 µL de água (DNAse/RNase *free water*)

No dia seguinte após a microinjeção os animais, com 24 hpf, foram retirados dos seus córions com o auxílio de agulhas em microscópio óptico e o desenvolvimento observado.

Quando necessário, a pigmentação dos animais foi evitada utilizando uma solução de 0,003% de 1-fenil-2-tiouréia (Sigma-Aldrich) durante as primeiras 24 hpf.

Os grupos de microninjeção de MO foram os seguintes:

- MO bloqueio tradução do gene *glb1*: animais microinjetados com o MO desenhado para a região promotora do gene *glb1*, silenciando consequentemente a expressão da enzima β -galactosidase.
- MO controle para a região promotora do gene *glb1*: animais microinjetados com MO controle específico para a região promotora.

- MO para sítio de *splice* no gene *glb1*: animais microinjetados com o MO para sítio de *splice* do gene *glb1*, permitindo um silenciamento parcial da expressão da enzima β -galactosidase, assim como uma menor toxicidade para o embrião.
- MO controle para sítio de *splice* no gene *glb1*: animais microinjetados com MO controle específico para sítio de *splice*.
- Controle não-injetado: animais que não foram microinjetados, permitindo a comparação com os animais dos demais grupos citados.

Durante todo o período de funcionamento do MO os animais foram observados em estereomicroscópio NIKON SMZ18 com lentes SHR Plan Apo 1x WD:60 para avaliação fenotípica inicial.

Para confirmar que o fenótipo observado era devido à diminuição ou ausência de β -galactosidase um MO (GCGCCATTGCTTTGCAAGAATTG) para o gene *p53* foi coinjetado.

Com relação aos efeitos *off-target*, aproximadamente 15 a 20% dos oligos morfolinicos levam a isso além do fenótipo relacionado ao silenciamento do gene alvo. Essas características não são apresentadas por mutantes para o mesmo gene, por essa razão são independentes da inativação ou redução da expressão do gene alvo. Geralmente ocorre morte neuronal um dia após a fertilização, pois os animais evoluem com cabeça e olhos pequenos, defeitos de notocorda e, eventualmente, malformações craniofaciais⁷¹.

Robu et al. (2007)⁷² demonstraram que os efeitos *off-target* podem ser reduzidos mediante a coinjeção de um morfolino para o gene *p53*, uma vez que o oligo impede a expressão desse gene evitando, assim, a ativação da via da apoptose mediada pelo mesmo. Além disso, também comprovaram que o silenciamento dessa via não afeta os fenótipos induzidos por outros morfolinicos. Por essa razão foi escolhido esse método para confirmação do fenótipo apresentado pelos animais.

3.5. Desenho experimental

Inicialmente foi realizada a determinação da dose a ser microinjetada com base na literatura^{73, 74}. O primeiro experimento foi realizado com a injeção de 2 ng/dL tanto para animais do grupo morfolino quanto para mismatch. Após essa etapa, o fenótipo foi definido e os experimentos foram realizados de acordo com o fluxograma abaixo (Figura 10). Para isso os animais que apresentavam as características morfológicas foram separados e selecionados para os testes.

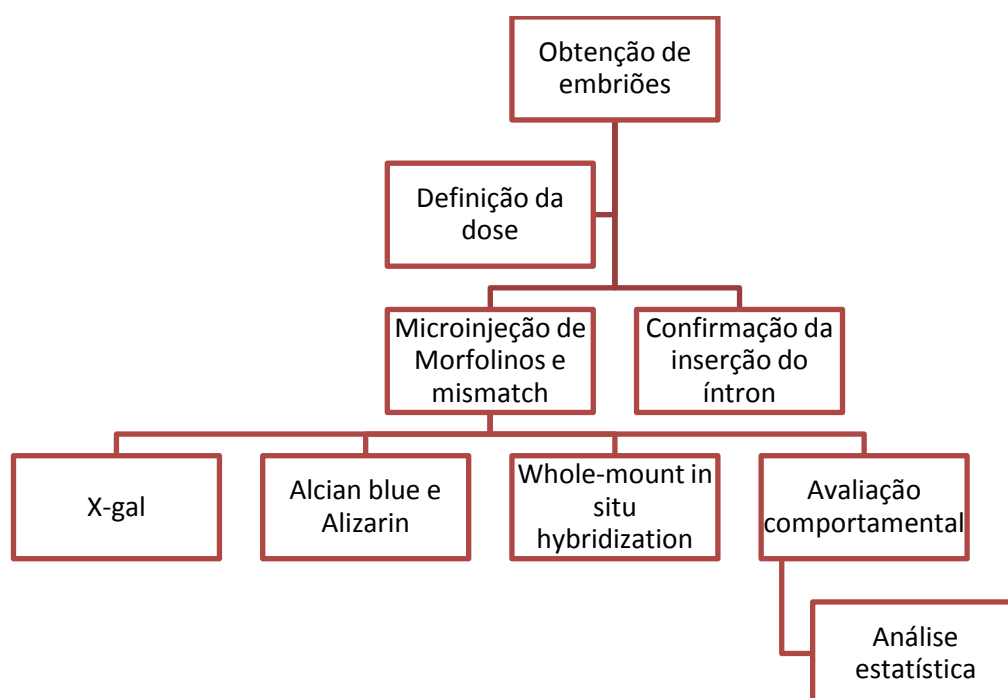


Figura 10: Fluxograma representando a ordem dos experimentos realizados.

3.5. Confirmação da inserção do íntron com sequenciamento por eletroforese capilar

O morfolino de sítio de *splice* foi desenhado para a região final do éxon 5 e início do íntron 5-6, com o objetivo de inserir o íntron 6 levando a uma alteração na formação da proteína e consequente diminuição da atividade enzimática.

Para que fosse possível fazer a avaliação da correta inserção do intron 5-6 pelo MO de sítio de *splice* 20 larvas do grupo microinjetado com esse MO foram sacrificadas por submersão em gelo e o RNA total foi extraído com Trizol e submetidos à transcrição reversa com *high capacity cDNA reverse transcription kit*. As amostras foram então submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR) com a seguinte sequência de primers: 5'

TACCTTGCAGCAGTGGACAA 3' (sense); 5' GGCTCAGATGACGCATGTAGT 3' (antisense), e sua qualidade analisada em gel de agarose 1,5%.

Após a PCR os *amplicons* foram submetidos ao sequenciamento por eletroforese capilar utilizando o método de Sanger com o *Kit BigDye® Terminator Cycle Sequencing Standart Version 3.1* no equipamento ABI 3500xL (*Life Technologies®*).

Os resultados obtidos foram registrados em eletroferogramas e analisados com o programa *Chromas Lite®*. A sequência foi comparada com aquelas disponíveis para o gene *glb1* em bancos de dados (Gene ID: 548343; ZFIN: ZBD-GENE-050410-9; Ensembl: ENSDARG00000036415).

3.6. Avaliação enzimática

3.6.1. Teste de X-gal

A confirmação da redução da atividade enzimática de β -galactosidase foi realizada através do teste *in situ* para X-gal (5-Bromo-4-cloro-3-indol β -D-galactopiranosídeo). Trata-se de um substrato cromogênico que, ao interagir com a enzima, produz uma cor azul que pode ser facilmente detectada (Figura 11). O protocolo utilizado foi uma adaptação do publicado por Fan et al. (2010)⁷⁵. Os embriões com três dpf foram anestesiados e sacrificados por imersão em gelo e em seguida fixados em paraformaldeído 4% a 4°C *overnight*, no dia seguinte foram realizadas seis etapas de lavagem, sendo três vezes por 10 minutos com PBS [tampão fosfato salino: 137 mM de NaCl (cloreto de sódio), 10 mM de Na₂HPO₄ (fosfato dissódico), 2,7 mM de KCl (cloreto de potássio) e 1,8 mM de KH₂PO₄ (fosfato monopotássico)] pH 7.4 e mais três vezes de 15 minutos com PBS pH 6, sendo que todas as etapas de lavagem foram realizadas a 4°C. Em seguida, os animais foram incubados *overnight* a 37°C com a solução de coloração [1 mg/mL de X-gal em PBS pH 6, contendo 2 mM MgCl₂ (cloreto de magnésio), 5 mM de K₄Fe(CN)₆ (ferrocianeto) e 5 mM de K₃Fe(CN)₆ (ferricianeto) (Sigma-Aldrich) que foi pré-aquecida por 20 minutos a 37°C.

Os resultados foram observados em estereomicroscópio Leica ZFLII com epifluorescência e fotografados com câmera digital Nikon DS-F12.

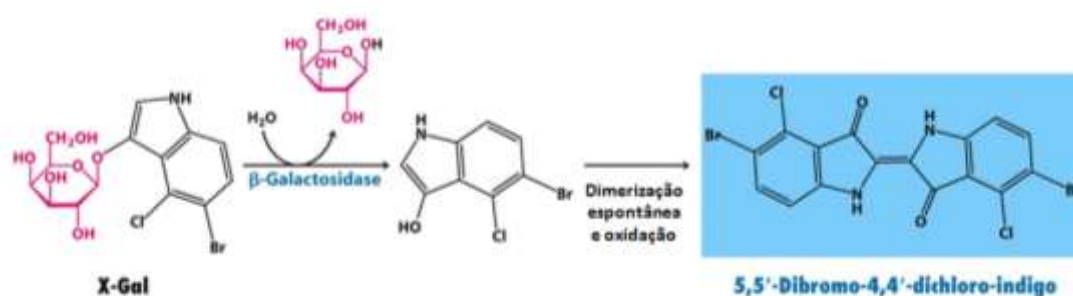


Figura 11: Representação esquemática da reação que ocorre durante o teste de X-gal. Quando a molécula interage com a enzima ocorre a hidrólise da ligação glicosídica de β-D-galactose. Dessa reação se origina a molécula de 5-bromo-4-cloro-3-hidroxiindole, que em seguida sofre dimerização espontânea e oxidação, formando 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo, um produto intensamente azul e insolúvel. Adaptado de *Biochemistry*, 7th edition, 2012⁷⁶.

3.6.2. Whole-mount *in situ* hybridization (WISH)

WISH é uma técnica utilizada para visualizar a localização de RNAs expressos em embriões de *zebrafish*. Para isso, sondas de RNA produzidos sinteticamente e marcadas com digoxigenina são hibridizadas aos transcritos do gene alvo. Com a detecção das probes é possível revelar padrões espaciais da expressão do gene alvo. O protocolo utilizado nesse trabalho foi descrito por Thisse & Thisse (2008)⁷⁷, e permite a avaliação da expressão gênica ao longo de todo o embrião.

Os animais foram sacrificados por imersão em gelo e colocados em PFA 4%, *overnight* a 4°C. Fazer a fixação dessa maneira foi importante por se tratar de um protocolo longo. Após a fixação, as larvas puderam ser colocadas em metanol 100% e mantidas a -20°C por vários meses.

O protocolo foi realizado em três dias, sendo que o primeiro serviu para a reidratação com lavagens sucessivas de metanol e PBS, seguida por uma digestão enzimática com proteinase K que permitiu a permeabilização das larvas. O tempo de exposição à enzima foi fundamental para a finalização correta do teste e imediatamente após as larvas deviam ser mantidas em PFA 4% por 20 minutos para garantir a inativação da proteinase. Após sucessivas lavagens com PBS as amostras foram pre-hibridizadas por 5 horas em tampão de hibridização [30 mL de formamida, 12,5 mL de SSC (tampão de citrato de sódio salino) 20x, 50 µL de *tween* 20, 10 µL tRNA 500 mg/mL, 100 µL de heparina 5 mg/mL]. Após esse tempo

a solução foi substituída por 200 µL de tampão de hibridização contendo 200 ng da sonda RNA marcada com digoxigenina (DIG) para o gene *glb1* e mantidas a 65°C *overnight*.

No segundo dia as amostras foram lavadas sucessivamente com SSC e PBS para retirada de hibridização inespecífica, após essa etapa o bloqueio foi feito durante três horas com o tampão feito para essa finalidade (2% soro de ovelha / 2 mg/mL de BSA em PBS). Depois desse período a solução precisou ser removida e substituída por anti-DIG [anti-DIG diluído 1:5000 em PBST / 2% soro de ovelha / 2 mg/mL albumina de soro bovino)], com as amostras mantidas a 4°C *overnight*.

No terceiro dia o antisoro foi removido e após as lavagens com PBS as amostras seguiram para a etapa de coloração com NBT/BCIP em tampão de coloração (100 mM tris HCl pH 9,5 / 50 mM cloreto de magnésio/ 100 mM cloreto de sódio / 0,1% *tween* 20). Para isso as larvas precisaram ser transferidas para uma placa de 24 poços. Após a adição da solução de NBT/BCIP a placa foi envolvida em papel alumínio e permaneceu sob agitação suave a temperatura ambiente. A coloração precisou ser monitorada a cada 15 minutos em estereomicroscópio. Quando suficiente, a reação foi interrompida com adição de solução de PBS pH 5,5 / 1 mM EDTA. As larvas coradas podem ser armazenadas em solução de parada a 4°C por vários anos.

3.7. Teste de *Alcian blue* e *Alizarin*

A coloração das cartilagens foi feita com *Alcian Blue*, um corante que tem afinidade pelos polissacarídeos sulfatados da matriz cartilaginosa, enquanto a coloração dos ossos foi realizada com *Alizarin Red S*, que tem afinidade por sais de cálcio.

Esse método se baseia no uso de *Alcian blue* para corar a matriz extracelular dos condrócitos. Por se tratar de um corante composto por moléculas positivas ocorre uma interação química com o colágeno (carregado negativamente), formando um composto pouco solúvel e identificado com a cor azul⁷⁸.

Com relação ao *alizarin red S* ocorre a interação com um átomo de cálcio de acordo com a fórmula: $2 \text{ C}_{14}\text{H}_7\text{NaO}_7\text{S} + \text{CaCl}_2 \rightarrow (\text{C}_{14}\text{H}_7\text{O}_7\text{S})_2\text{Ca} + 2 \text{ NaCl}$. Essa ligação também origina um composto pouco solúvel de coloração vermelha intensa, levemente arroxeada.

O protocolo utilizado foi elaborado de acordo com Solomon et al., 2003⁷⁹ e Walker & Kimel (2007)⁸⁰, como descrito brevemente a seguir: as larvas foram mantidas em PTU (Feniltiouréia) 0,003% em solução E3 (5 mM NaCl; 0,17 mM de KCl; 0,33 mM de MgSO₄) com

azul de metileno a partir de 24 hpf. Posteriormente, as larvas foram sacrificadas por submersão em gelo a partir de 96 e 120 hpf e transferidas para um tubo de 1,5 mL devidamente identificado ao qual, após a cuidadosa retirada da água, foi adicionado 500 µL de paraformaldeído 2% em PBS (tampão fosfato-salino) e homogeneizado delicadamente por inversão. Os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por 60 minutos. Após essa etapa as larvas foram lavadas com etanol 50% e mantidas nessas condições por 10 min. Imediatamente após a remoção do etanol foi adicionado ao tubo com as larvas 1 mL da solução de *Alcian blue* (0.02% *Alcian Blue*, 60 mM MgCl₂ e 70% etanol) e foram colocados sob agitação e ao abrigo da luz por duas horas. Após esse período a solução de *Alcian blue* foi substituída por 1 mL de *alizarin* (0,5% de *alizarin S* diluído em água) e as amostras foram mantidas nas mesmas condições por mais 60 minutos. Em seguida as larvas foram lavadas rapidamente com água e colocadas em uma solução de 1,5% de H₂O₂ e 1% KOH por 20 minutos e então foram iniciadas as etapas de lavagem *overnight* sob agitação em temperatura ambiente, primeiramente com 1 mL de solução de 20% glicerol e 0,25% KOH e no dia seguinte com 50% glicerol e 0,25% KOH. As larvas foram observadas na mesma solução em estereomicroscópio e armazenadas por vários meses.

Após a avaliação dos resultados os animais foram fotografados no microscópio *Axio Imager 2 for Life Science Research* da *Zeiss International*. As medidas foram realizadas com o *software Adobe Photoshop CC 2017*.

3.8. Avaliação comportamental

A primeira forma de avaliação comportamental foi realizada na câmara de observação do equipamento *Danio Vision* (*Noldus Information Technologies*), projetado para testes de alto rendimento de larvas de *zebrafish* em placas de até 96 poços. Para isso, 12 animais com cinco dpf e que apresentavam o fenótipo, foram acondicionados isoladamente, de maneira randomizada em uma placa de 96 poços e um período de 15 minutos foi aguardado para a ambientação das larvas. Após esse período a placa foi filmada por 60 minutos e a distância percorrida, a velocidade e o tempo de movimento foram medidos pelo *software EthoVision XT* (*Noldus Information Technologies*).

Em seguida foi realizado o teste de reação ao toque, com os mesmos 12 animais, sendo que as larvas foram retiradas da placa de 96 poços e mantidas em placas de Petri por 15 minutos para ambientação e após esse período foi utilizada uma agulha de 0,7 mm para

tocá-las na região frontal. A reação dos animais foi gravada utilizando uma câmera *GigE monochrome* com lentes *Std CS mount* 4,5 - 12,5 mm 1/2. A distância percorrida pelos animais bem como a velocidade foram medidas com o *software EthoVision XT*.

3.9. Análise estatística

Os dados são apresentados como valores médios $\pm$ SEM. A análise estatística foi realizada usando *GraphPad Prism* versão 7.03 (*GraphPad Software*). Em todas as análises, o nível de significância foi definido em $p \leq 0,05$. As comparações estatísticas entre os três grupos foram realizadas com o teste de Kruskal-Wallis seguida do teste *post hoc* de Dunn. Os parâmetros avaliados para os dois testes (60 minutos em DanioVision e reação ao toque) foram distância percorrida e velocidade.

4. Resultados

4.1. Análise fenotípica

Os animais foram observados diariamente desde a fertilização até o quinto dia, quando o oligo MO começa a perder a sua função de inibição.

As características que poderiam estar relacionadas ao fenótipo ficaram mais evidentes quando os animais estavam com 48 hpf, sendo elas a fronte protusa, a extensão diferenciada do saco vitelínico e a malformação de cauda (Figura 12).



Figura 12: Embriões de *zebrafish* com 30 hpf. Nos painéis **1 e 2**, embriões microinjetados com 2 ng de morfolino controle *mismatch*. Nos painéis **3 e 4**, embriões microinjetados com 2 ng de morfolino para a região promotora. **A** face protusa. **B** extensão diferenciada do saco vitelínico. **C** malformação de cauda. Escala: 200 μm.

Importante notar que 11 de 25 embriões microinjetados com essa dosagem apresentaram microftalmia e edema cardíaco com consequente malformação mandibular, que são efeitos *off-target* já conhecidos⁷⁰ (Figura 13).



Figura 13: embriões de *zebrafish* com 48 hpf microinjetado com 2 ng de morfolino para a região promotora apresentando efeitos *off-target*. **A** microftalmia e **B** edema cardíaco e consequente malformação mandibular. Escala: 200 μ m.

Após essa análise inicial considerou-se que a dose de 2 ng levou a efeitos *off-target* indesejados e, devido a alta mortalidade inicial (38 embriões em um grupo de 63 microinjetados), foi considerada tóxica para os animais. Visando reduzir todos esses efeitos, os testes foram repetidos utilizando uma dose menor (1,5 ng) e, além disso, foram utilizadas as mesmas doses (1,5 e 2,0 ng) com a co-injeção de um morfolino para o gene p53 (4 ng) como demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2: distribuição dos experimentos realizados. ATG-MO: morfolino para a região promotora; p53-MO: morfolino para o gene *p53*

Grupos	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Quantidade material microinjetado	1,5 ng ATG-MO	2,0 ng ATG-MO	1,5 ng ATG-MO	2,0 ng ATG-MO
			+	+
			4 ng p53-MO	4 ng p53-MO

Para os grupos em que foram injetadas doses menores (1 e 3) a apresentação fenotípica foi constante entre eles, porém muitas características não foram observadas. Nenhum deles apresentou alteração na extensão do saco vitelínico ou de cauda, assim como apenas 12 de um total de 52 animais apresentaram a fronte protusa (Figura 14).

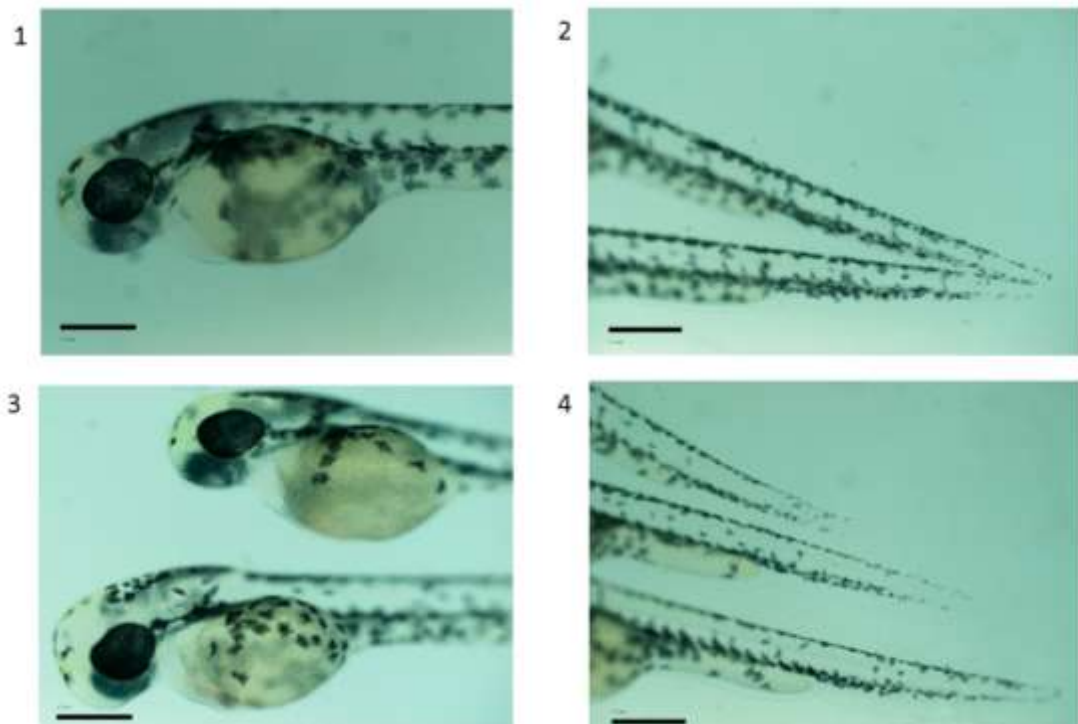


Figura 14: embriões de *zebrafish* com 48 hpf microinjetados com 1,5 ng de morfolino para bloqueio da tradução e mismatch. **1 e 2** embriões microinjetados com morfolino *mismatch*; **3 e 4** embriões microinjetados com morfolino para a região promotora, apenas um com frente protusa e sem alteração na extensão do saco vitelínico e cauda. Escala: 200 μ m.

Com relação aos grupos 2 e 4 foi possível observar uma maior estabilidade nos animais em que o morfolino para o gene *p53* foi coinjetado. Todos apresentaram as malformações facial, de extensão de saco vitelínico e de cauda, sem efeitos *off-target* observados anteriormente. Por esse motivo foi feita uma microinjeção de uma dose intermediária de 1,75 ng sem coinjeção de morfolino para o gene *p53*. Nessa condição foi possível observar duas das alterações previamente encontradas e apenas a malformação na cauda ficou mais discreta nos animais com 48 hpf (Figura 15). Com essa dose a mortalidade também reduziu para 26% na primeira microinjeção (53 animais em um total de 71).

Nos embriões microinjetados com MO para a região de sítio de *splice* a dose microinjetada inicial foi maior, considerando que o efeito tóxico desse tipo de MO pode ser menor. Com a microinjeção de 2,5 ng/dL nenhuma alteração foi encontrada, por essa razão as microinjeções seguintes foram realizadas em escala (2,5 - 3,0 - 3,5 - 4,0 - 4,5 - 5,0 - 5,5 ng/dL).

Até a dosagem de 3,5 ng os animais não apresentaram nenhuma alteração relacionada ao fenótipo observado anteriormente. Com as dosagens de 4,0 e 4,5 ng alguns embriões começaram a apresentar alterações de face, porém tais achados não eram constantes entre os animais. Por fim, com as últimas dosagens testadas de 5,0 e 5,5 ng os animais estavam estáveis, porém o fenótipo mais parecido com o encontrado utilizando o MO para a região promotora foi com a microinjeção de 5,5 ng (Figura 16).



Figura 15: embriões de *zebrafish* com 48 hpf microinjetados com 1,75 ng de morfolino para bloqueio da tradução e controle mismatch. **1** controle microinjetado com morfolino *mismatch*. **2** embrião microinjetado com morfolino para bloqueio da tradução **A** frente protusa **B** alteração na extensão do saco vitelínico e **C** discreta mal formação de cauda. Escala: 200 µm



Figura 16: embriões de *zebrafish* com 48 hpf microinjetados com 5,5 ng de morfolino para a região de sítio de *splice* e controle mismatch. **A:** alterações faciais, **B:** extensão diferenciada do saco vitelínico e **C** discreta malformação de cauda. Escala: 200 μ m

4.3. Teste de *Alcian blue* e Alizarin

A partir das 96 hpf as alterações esqueléticas cartilaginosas ficaram evidentes. Durante essa fase do desenvolvimento já era possível avaliar o comprometimento das cartilagens de Meckel, ceratobranquiais, ceratoiais, hiosimplética e palatoquadrada do grupo MO em comparação com o grupo controle. Todas as estruturas citadas estavam menos desenvolvidas e com a forma alterada quando comparadas aos animais controles. Sete dos 13 animais em que foram submetidos a esse teste apresentaram o mesmo padrão de desenvolvimento.

Com 120 hpf, um grupo de nove animais foi testado sendo que em cinco deles observou-se a progressão das malformações (Figuras 18 e 19). Após esse período os ossos do opérculo estão calcificados e a diferença de tamanho dos animais fica mais evidente como demonstrado na Tabela 4.

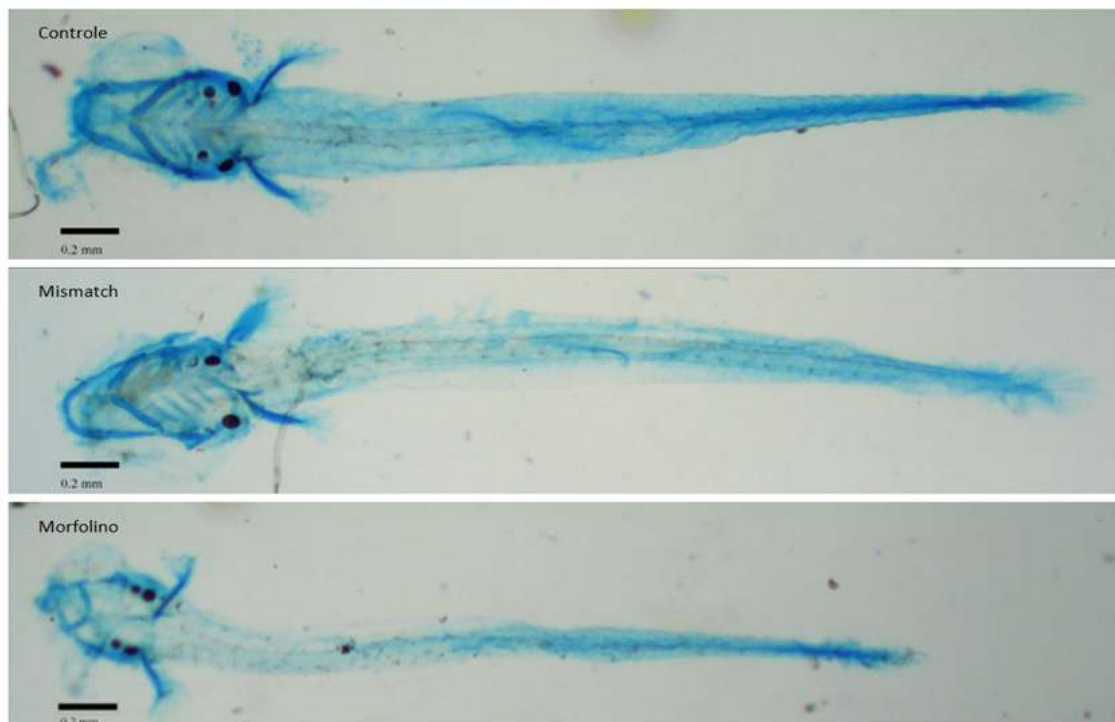


Figura 18: Larvas de *zebrafish* com 120 hpf coradas pelo método de *alcian blue* e alizarin, método que permite a coloração de cartilagens (azul) e ossos (roxo). Nessa fase do desenvolvimento das larvas as cartilagens da região da cabeça estão formadas e serão a base para a ossificação.

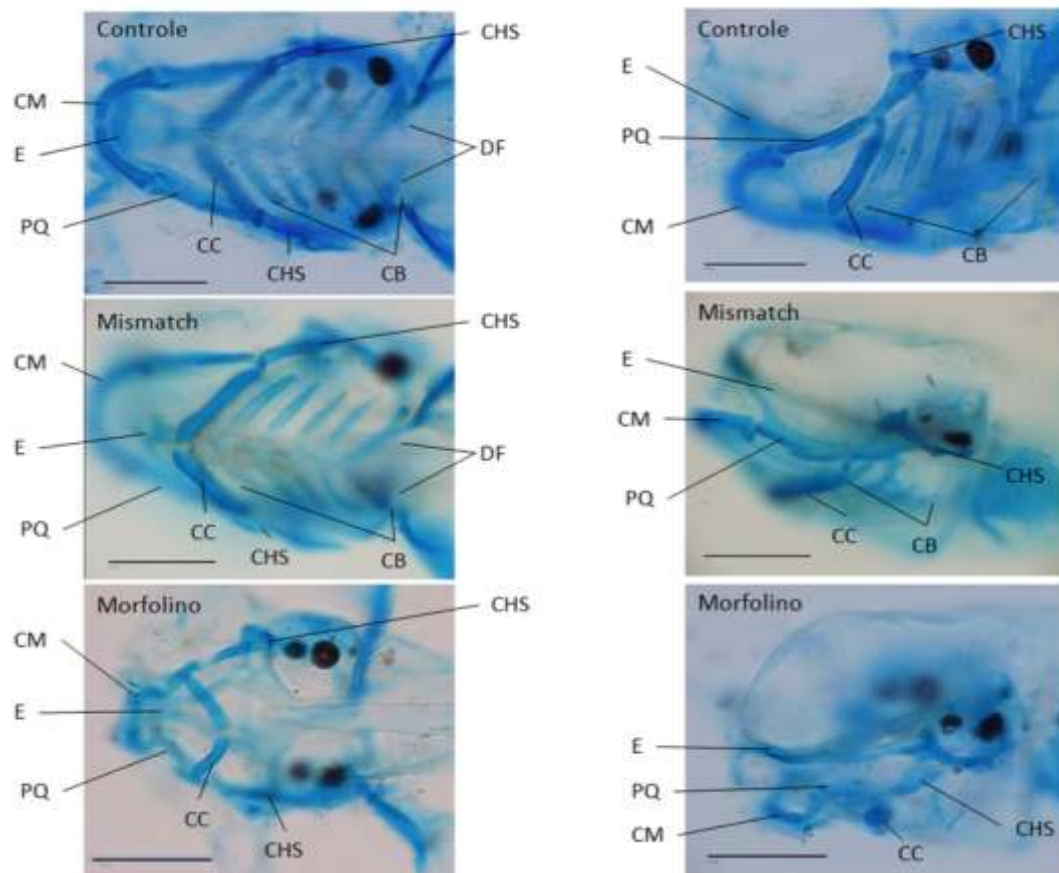


Figura 19: Larvas de *zebrafish* com 120 hpf coradas pelo método de *alcian blue* em posição ventral e lateral. CM: cartilagem de Meckel, CB: ceratobranquial, CC: ceratoial, CHS: hiosimplética, PQ: palatoquadrada, E:etmóide, DF: dentes faríngeos. Escala 200 µm.

Tabela 4: comparação do tamanho médio das cartilagens dos embriões com 120 hpf.

Parâmetros	Grupo			Estatística (Valor de <i>p</i>)
	Grupo Controle (n=5)	Morfolino Mismatch (n=5)	Grupo Morpholino (n=5)	
Comprimento total da larva	3,49 mm	3,51 mm	3,00 mm	0,0427
Comprimento da cabeça	610 µm	615 µm	406µm	0,0207
Comprimento cartilagem ceratorial	183 µm	192 µm	115,2 µm	0.0181
Distância entre a porção distal das cartilagens de Meckel	178,5µm	185 µm	94,18 µm	0,0071
Comprimento cartilagem de Meckel	153,2 µm	145,1 µm	94,2 µm	0,0051
Distância entre as cartilagens hiosimpléticas	340 µm	360 µm	210,3 µm	0,0071
Distância entre as cartilagens palatoquadradas	190,4 µm	202,3 µm	122,3 µm	0,0051
Comprimento das cartilagens palatoquadrada	221,2 µm	204,7 µm	54 µm	0,0051
Comprimento da placa etimoide	441,3 µm	451,5 µm	274,8 µm	0,0051
Comprimento das cartilagens ceratobranquiais	1: 150 µm	1: 174,3 µm	1: -	
	2: 122,4 µm	2: 143,7 µm	2: -	
	3: 81,7 µm	3: 127 µm	3: -	-
	4: 97,5 µm	4: 119,3 µm	4: -	
	5: 101,5 µm	5: 156,6 µm	5: -	
Comprimento dos dentes faríngeos	49,5	49	-	-

(-) não apresentaram desenvolvimento das cartilagens ceratobranquiais e dos dentes faríngeos.

4.4. Avaliação enzimática

4.4.1. Teste de X-gal

Foi utilizado o teste qualitativo de X-gal para a confirmação da expressão de β -galactosidase. O teste inicial foi realizado em animais *wild type* não microinjetados e foi possível observar a atividade da enzima β -galactosidase no cristalino, saco vitelínico e sistema nervoso central.

Apesar de ser possível uma boa visualização da expressão enzimática os testes foram repetidos com animais 72 hpf e 96 hpf microinjetados com MO, controle *mismatch* e *wild type* não injetados. Nesse experimento identificou-se a ausência completa de β -galactosidase na formação do sistema nervoso central, além do aumento gradativo da sua expressão e também a diminuição da atividade do MO com 96 hpf (Figura 20).

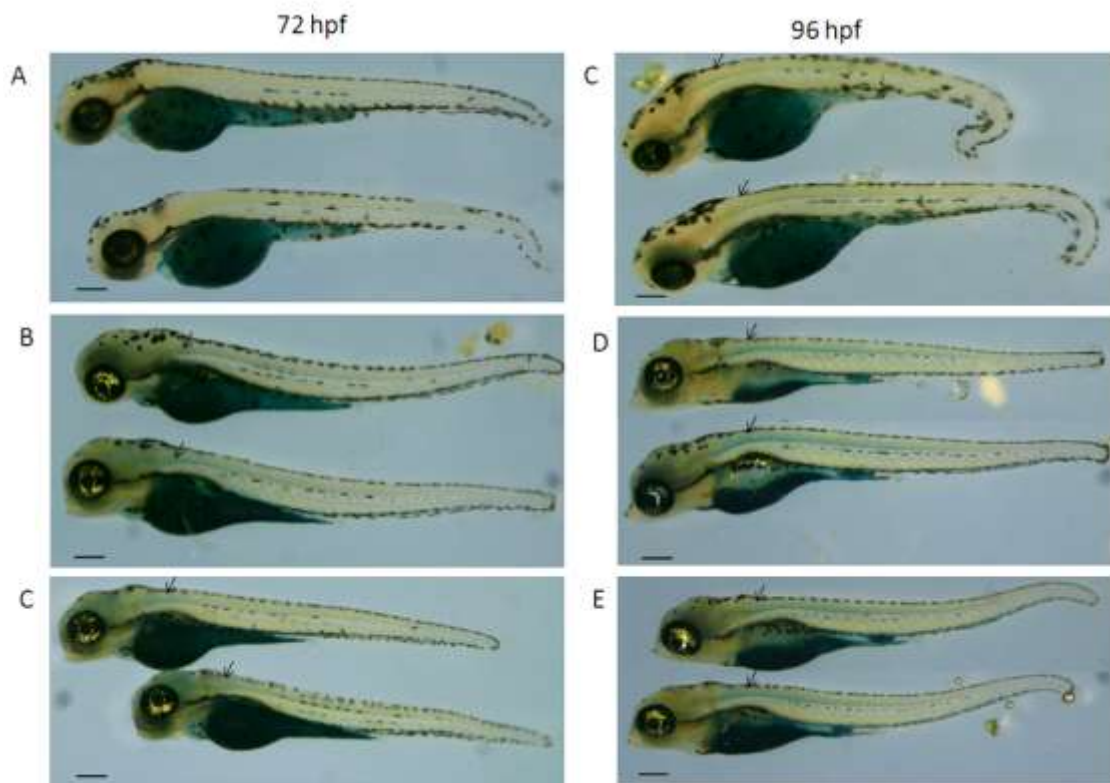


Figura 20: Resultados do teste de X-gal em larvas de *zebrafish* com 72 e 96 hpf. **A - C:** larvas de *zebrafish* com 72 hpf. **A:** animais microinjetados com MO, em que é possível observar a ausência completa de β -galactosidase no sistema nervoso central. **B:** animais microinjetados com controle *mismatch* e **C:** controles *wild type* não microinjetados, nos quais se identifica a expressão enzimática na formação do sistema nervoso central (seta). **D-F:** embriões de *zebrafish* 96 hpf. **D:** animais microinjetados com MO, que apesar de apresentarem uma menor atividade enzimática que os grupos controle *mismatch* (**E**) e *wild type* (**F**) já é possível identificar a

presença da β -galactosidase e pode-se associar este fato a uma diminuição funcional do oligo MO. Escala: 200 μ m

4.4.2. WISH

Nos cinco animais controles foi possível observar a presença de RNA para o gene *glb1* nas regiões do cerebelo, telencéfalo, tubo neural e fígado (Figura 21).

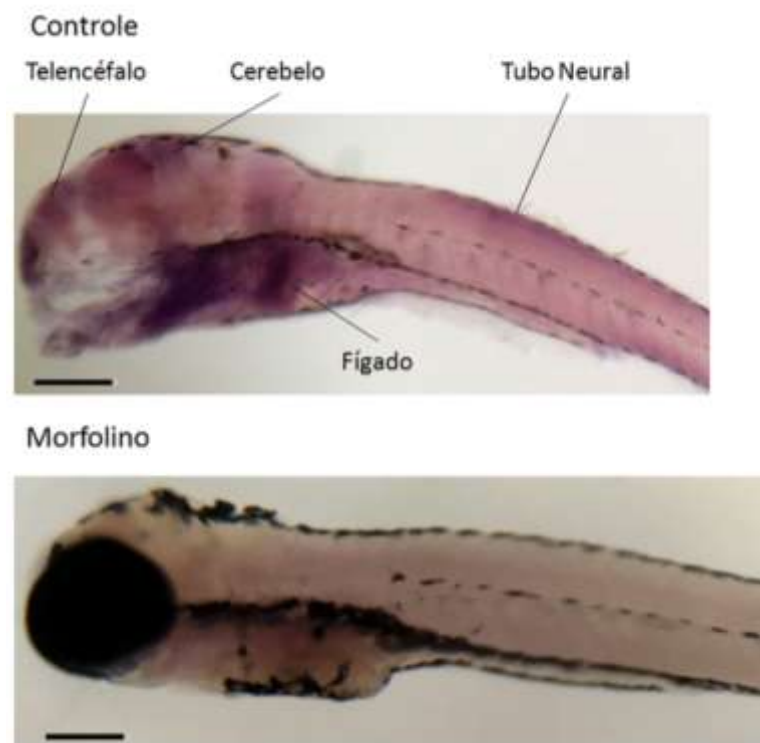


Figura 21: Larvas de *zebrafish* com 120 hpf coradas pelo método de WISH. Evidenciando a presença de RNA mensageiro na região do telencéfalo, cerebelo e tubo neural, enquanto no animal em que foi microinjetado o morfolino para bloqueio da tradução a mesma coloração não é observada.

A avaliação da expressão da enzima β -galactosidase pelo método de WISH confirmou os resultados obtidos previamente com o teste de X-gal. A análise dos animais controle permitiu a observação da funcionalidade dessa enzima no sistema nervoso central das larvas, assim como a ausência completa observada nos MO confirma o silenciamento do gene pelo oligo.

4.5. Avaliação comportamental

A avaliação comportamental foi dividida em duas etapas. Durante a primeira, os animais foram observados durante 60 minutos e os resultados obtidos para a distância percorrida e velocidade entre os grupos morfolino e controle ($P=0,0178$) foram significativos para o teste de Kruskal-Wallis. A média $\pm$ o erro padrão (SEM) e o valor de p para cada grupo durante a observação por 60 minutos estão descritos no Quadro 1.

Quadro 1: Média $\pm$ SEM para distância percorrida e velocidade das larvas de *zebrafish* com 5 dpf durante a observação por 60 minutos de cada grupo analisado e valor de p para a comparação entre os três grupos pelo teste de Kruskal-Wallis.

Distância (mm)		
Grupo	Média ± SEM	Valor p
Controle	3.461 ± 620	0,0223
Mismatch	2.175,5 ± 431,5	
Morfolino	1.408,8 ± 627,6	
Velocidade (mm/s)		
Grupo	Média ± SEM	Valor p
Controle	0,93 ± 0,17	0,0223
Mismatch	0,58 ± 0,12	
Morfolino	0,38 ± 0,17	

O valor de p corrigido para o teste *post hoc* de Dunn foi de 0,69 entre os grupos controle e *mismatch*, 0,018 entre os grupo controle e MO e 0,36 entre os grupos *mismatch* e MO. Esses valores corrigidos foram iguais para ambos os testes de distância e velocidade

durante a observação por 60 minutos (Figuras 22 e 23).

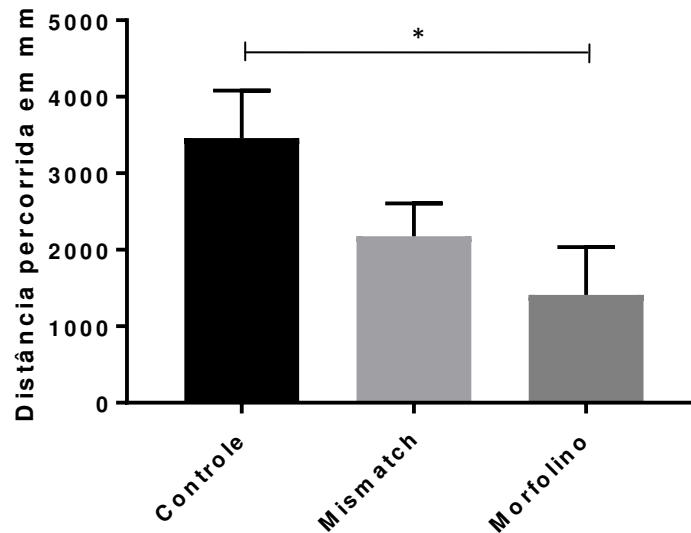


Figura 22: Distância percorrida por larvas de *zebrafish* com 5 dpf com o gene *glb1* silenciado pela técnica de morfolino e os dois grupos controle durante a análise da atividade locomotora por 60 minutos. Os animais do grupo controle foram originados da mesma fertilização e tratados de forma idêntica, porém sem a microinjeção de nenhum tipo de morfolino. Nos animais do grupo morfolino foi microinjetado um oligo para silenciamento do gene *glb1* enquanto no grupo *mismatch* o oligo injetado não tinha afinidade por nenhuma região do genoma do *zebrafish*. Com 5 dpf as larvas foram transferidas para uma placa de 96 poços e ambientadas durante 15 minutos. Após esse período a atividade locomotora para cada grupo foi registrada por 60 minutos com o sistema automático de rastreamento de vídeo Danio Vision. A distância percorrida e a velocidade de cada larva de cada grupo (n=12 por grupo) foi medida com o *EthoVision XT*. Os dados são apresentados como média ± SEM. O teste de Kruskal-Wallis seguido do teste *post hoc* de Dunn foi realizado para determinar diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Um asterisco (*) indica que $p \leq 0,05$.

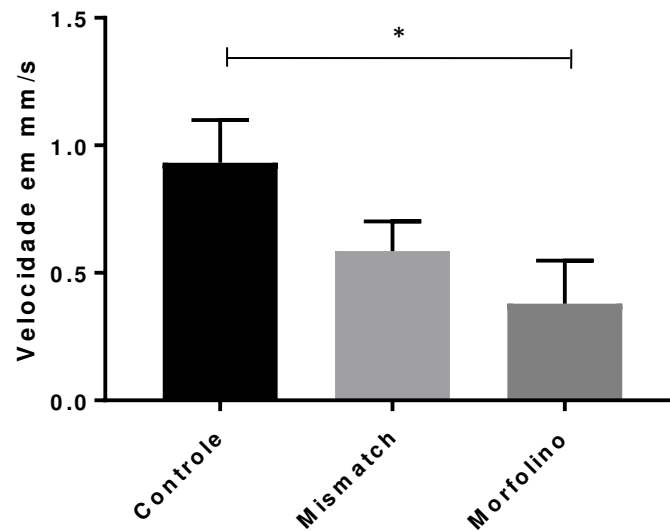


Figura 23: Velocidade das larvas de *zebrafish* com 5 dpf com o gene *glb1* silenciado pela técnica de morfolino e dos dois grupos controle durante a análise da atividade locomotora por 60 minutos. Os animais do grupo controle foram originados da mesma fertilização e tratados de forma idêntica, porém sem a microinjeção de nenhum tipo de morfolino. Nos animais do grupo morfolino foi microinjetado um oligo para silenciamento do gene *glb1* enquanto no grupo *mismatch* o oligo injetado não tinha afinidade por nenhuma região do genoma do *zebrafish*. Com cinco dpf as larvas foram transferidas para uma placa de 96 poços e ambientadas durante 15 minutos. Após esse período a atividade locomotora para cada grupo foi registrada por 60 minutos com o sistema automático de rastreamento de vídeo Danio Vision. A distância percorrida e a velocidade de cada larva de cada grupo (n=12 por grupo) foi medida com o *software EthoVision XT*. Os dados são apresentados como média ± SEM. O teste de Kruskal-Wallis seguido do teste *post hoc* de Dunn foi realizado para determinar diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Um asterisco (*) indica que $p \leq 0,05$.

Na segunda parte da avaliação comportamental foi aferida a reatividade ao toque de cada um dos grupos estudados ($n=12$ para cada grupo). Os resultados obtidos foram significativos para distância percorrida entre os três grupos ($p<0,0001$), assim como entre para velocidade ($p=0,0207$). Durante esse teste o fator que mais chamou a atenção foi a não reatividade dos animais do grupo MO, como mostra a Figura 26. A média $\pm$ SEM e o valor de p para cada grupo estudado no teste de reação ao toque estão descritos no Quadro 2.

Quadro 2: Média $\pm$ SEM para distância percorrida e velocidade das larvas de *zebrafish* com 5 dpf durante o teste de reação ao toque de cada grupo analisado e valor de p para a comparação entre os três grupos pelo teste de Kruskal-Wallis.

Teste reação ao toque		
Distância (mm)		
Grupo	Média ± SEM	Valor p
Controle	1.278,9 ± 377,9	0,0001
<i>Mismatch</i>	366,46 ± 10,8	
MO	10,67 ± 3,96	
Velocidade (mm/s)		
Grupo	Média ± SEM	Valor p
Controle	120,11 ± 31,29	0,0207
<i>Mismatch</i>	120,76 ± 50,93	
MO	89,2 ± 68,2	

O valor de p corrigido para o teste *post hoc* de Dunn foi de 0,46 entre os grupos controle e *mismatch*; $<0,0001$ entre os grupo controle e morfolino; e 0,0025 entre os grupos *mismatch* e morfolino para velocidade medida após o toque na região frontal das larvas. Para velocidade das larvas avaliada durante esse mesmo teste o valor de p foi $>0,99$ entre os

grupos controle e *mismatch*; 0,019 entre os grupo controle e morfolino; e 0,18 entre *mismatch* e morfolino (Figuras 24 e 25).

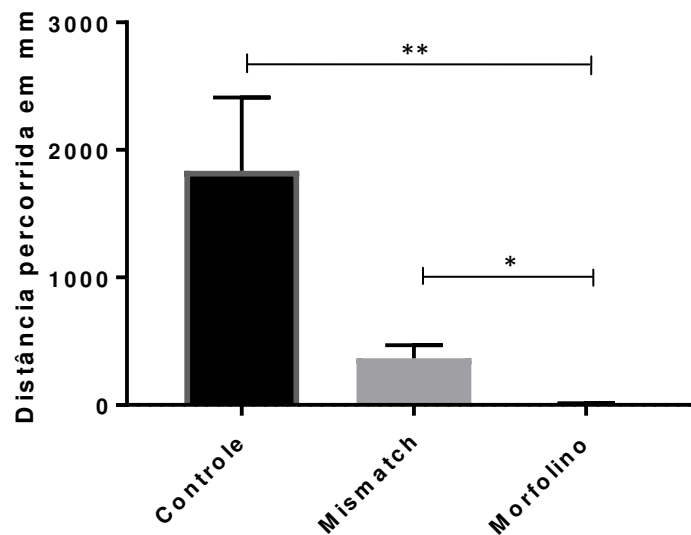


Figura 24: Distância percorrida por larvas de *zebrafish* com 5 dpf com o gene *glb1* silenciado pela técnica de morfolino e os dois grupos controle durante a análise da reatividade ao toque. Os animais do grupo controle foram originados da mesma fertilização e tratados de forma idêntica, porém sem a microinjeção de nenhum tipo de morfolino. Nos animais do grupo morfolino foi microinjetado um oligo para silenciamento do gene *glb1* enquanto no grupo *mismatch* o oligo injetado não tinha afinidade por nenhuma região do genoma do *zebrafish*. Após a observação por 60 minutos as larvas foram retiradas da placa de 96 poços e mantidas em placas de Petri por 15 minutos para ambientação e após esse período foi utilizada uma agulha de 0,7 mm para tocá-las na região frontal. A atividade locomotora para cada grupo foi registrada com o sistema automático de rastreamento de vídeo. A reação dos animais foi gravada utilizando uma câmera *GigE monochrome* com lentes *Std CS mount 4,5 - 12,5 mm 1/2*. A distância percorrida e a velocidade de cada larva de cada grupo (n=12 por grupo) foi medida com o *software EthoVision XT*. Os dados são apresentados como média ± SEM. O teste de Kruskal-Wallis seguido do teste *post hoc* de Dunn foi realizado para determinar diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Um asterisco (*) indica que $p \leq 0,05$; dois asteriscos (**) indicam $p \leq 0,01$.

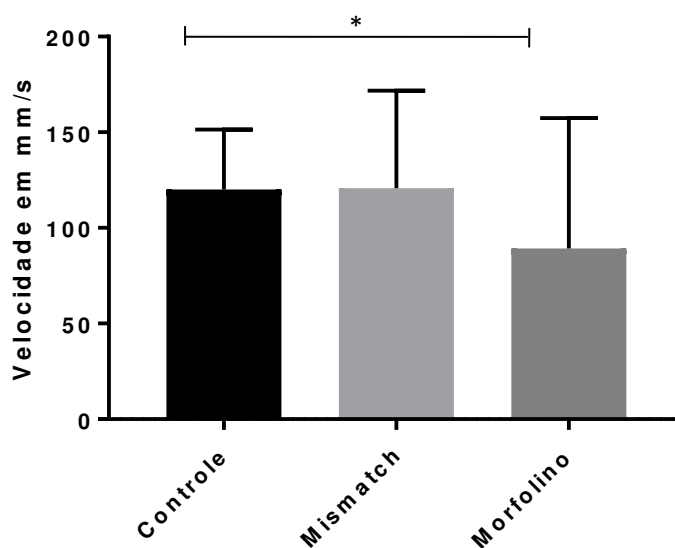


Figura 25: Velocidade das larvas de *zebrafish* com 5 dpf com o gene *glb1* silenciado pela técnica de morfolino e os dois grupos controle durante a análise da reatividade ao toque. Os animais do grupo controle foram originados da mesma fertilização e tratados de forma idêntica, porém sem a microinjeção de nenhum tipo de morfolino. Nos animais do grupo morfolino foi microinjetado um oligo para silenciamento do gene *glb1* enquanto no grupo *mismatch* o oligo injetado não tinha afinidade por nenhuma região do genoma do *zebrafish*. Após a observação por 60 minutos as larvas foram retiradas da placa de 96 poços e mantidas em placas de Petri por 15 minutos para ambientação e após esse período foi utilizada uma agulha de 0,7 mm para tocá-las na região frontal. A atividade locomotora para cada grupo foi registrada com o sistema automático de rastreamento de vídeo. A reação dos animais foi gravada utilizando uma câmera *GigE monochrome* com lentes *Std CS mount* 4,5 - 12,5 mm 1/2. A distância percorrida e a velocidade de cada larva de cada grupo (n=12 por grupo) foi medida com o *software EthoVision XT*. Os dados são apresentados como média ± SEM. O teste de Kruskal-Wallis seguido do teste *post hoc* de Dunn foi realizado para determinar diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Um asterisco (*) indica que $p \leq 0,05$.

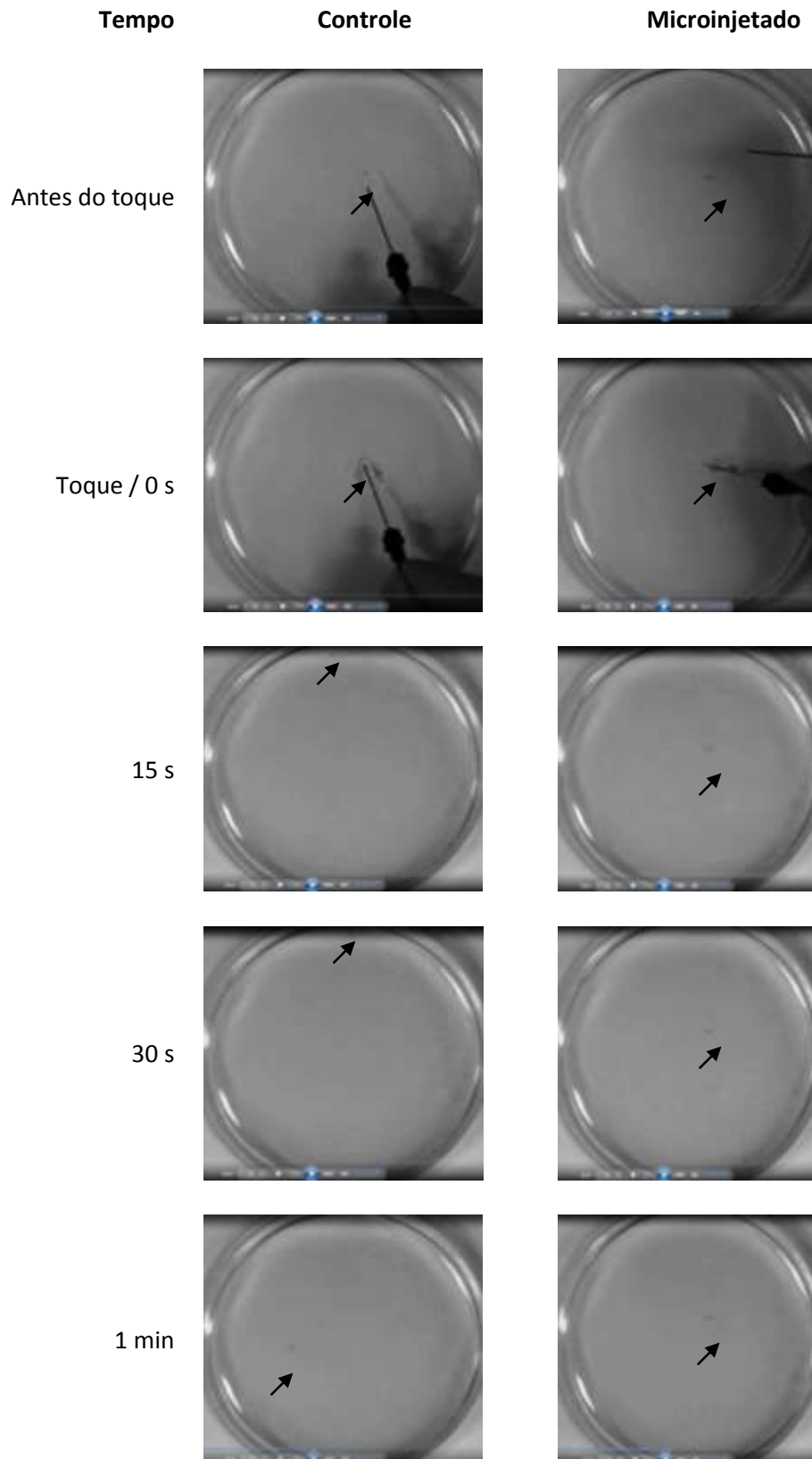


Figura 26: Larvas de zebrafish com 120 hpf durante o teste de reação ao toque (seta). Note que a larva microinjetada com MO não reage ao toque.

5. Discussão

Durante a observação do desenvolvimento dos embriões de *zebrafish* as alterações começaram a aparecer quando os animais estavam com 48 hpf e ficaram mais evidentes a partir do terceiro dia de desenvolvimento. Esses resultados eram esperados, porque de acordo com Fan e colaboradores (2010)⁷⁵, a expressão de β -galactosidase em *Danio rerio* começa em cerca de 20 nmol/mg/h e tem aumento exponencial a partir do segundo dia de vida (Figura 27).

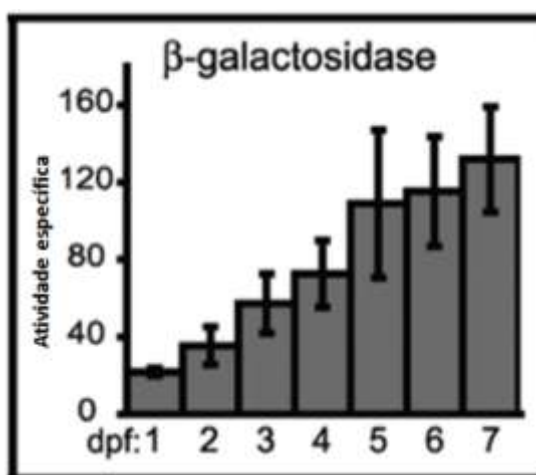


Figura 27: Aumento da atividade específica da enzima β -galactosidase durante o desenvolvimento embrionário do *zebrafish* (em nmol/mg/h) em embriões sem o saco vitelínico de 1 a 7 dpf. As barras de erro representam a variação entre três experimentos independentes. Adaptado de Fan et al., 2010⁷⁵.

A avaliação da expressão da enzima β -galactosidase foi realizada por dois testes diferentes e em ambos foi possível observar a inativação enzimática.

Pelo método de WISH a análise dos animais controle permitiu a observação da funcionalidade dessa enzima no sistema nervoso central das larvas, assim como a ausência completa observada nos MO confirma o silenciamento do gene pelo oligo.

A realização do teste de X-gal reforça esse resultado, porque nos animais testados com 72 e 96 hpf a expressão enzimática estava mais evidente nos animais controles. Observa-se, portanto, que a coloração azul está mais forte devido à maior concentração enzimática. Com 72 hpf não é possível identificar a β -galactosidase nos animais em que o gene *glb1* foi silenciado, o mesmo não acontece nos grupos controle *mismatch* e não injetado. Esse resultado confirma a funcionalidade do oligo MO, assim como o fato de que,

quando os animais estão com 96 hpf, apesar de ser mais discreta que nos dois grupos controles, já existe expressão de β -galactosidase no grupo em que foi microinjetado o MO para o gene *glb1*. Isso também está de acordo com a literatura e confirma a inativação progressiva do MO permitindo, gradualmente, o retorno da expressão gênica normal^{59, 60}.

Durante a avaliação fenotípica dos animais a extensão do saco vitelínico estava alterada. Os embriões de *zebrafish* dependem do saco vitelínico como fonte de aminoácidos, carboidratos e lipídeos durante o seu desenvolvimento inicial. O citoplasma das células que compõe essa estrutura contém glicogênio e proteínas granulares secretadas pelo fígado materno, liberadas na corrente sanguínea, absorvidas pelo oócito através da endocitose e, em seguida, armazenadas⁸¹. Por esse motivo mesmo no grupo de animais em que a expressão enzimática estava silenciada observa-se uma intensa coloração azul no saco vitelínico.

Fan et al. (2010)⁷⁵ observaram que a partir da segunda divisão celular e durante toda a fase inicial do desenvolvimento os embriões de *zebrafish* já apresentam deposição de β -galactosidase nesse local. Além disso, durante essa fase o *zebrafish* utiliza o saco vitelínico como reserva energética enquanto ainda não é capaz de se alimentar de maneira independente⁸², portanto a degradação de macromoléculas por hidrolases lisossômicas é essencial para a utilização das reservas do saco vitelínico durante a embriogênese⁷⁵. Assim é possível concluir que a remoção do terminal β -galactosil pode ter uma função importante durante esse processo.

Dois dias pós-fertilização a alteração de face nos embriões de *zebrafish* era sutil, porém com sugestiva correspondência ao engrossamento facial observado nos pacientes com gangliosidose GM1¹⁸, especialmente porque no grupo em que foi microinjetado MO para o gene *glb1* os animais parecem dismórficos se comparados com os grupos controle *mismatch* e não microinjetado. A mesma característica já havia sido descrita em gatos com Mucopolissacaridose tipo IV, em que apenas os animais afetados apresentaram uma discreta alteração facial que não foi observada no restante da ninhada⁸³.

A característica dismórfica mais marcante identificada nos embriões em que o gene foi silenciado era a malformação na cauda. Essa alteração era visível, porém sutil, a partir das 48 hpf. Com 72 hpf o comprometimento da cauda já era maior e facilmente identificável por análise visual. Com 96 hpf, mesmo com o retorno da atividade enzimática, as alterações já eram muito graves, comprometendo o nado e a postura do animal.

Após a gastrulação, durante o estágio de desenvolvimento da cauda (*tailbud stage*) um grupo de células indiferenciadas dará origem aos tecidos posteriores do corpo do *zebrafish*⁸⁴. As células da porção posterior se desenvolvem em músculos da cauda, enquanto aquelas que derivam da porção anterior formam principalmente os tecidos axiais, como a notocorda e a placa ventral do tubo neural⁸⁵. Algumas vias de sinalização estão conservadas durante essa fase do desenvolvimento incluindo a proteína óssea morfogenética (BMP), o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e a via Wnt/ β -catenin⁸⁶. Wnt e BMP estão mais ativas e junto com uma potencial sinalização de FGF levam à ativação de fatores de transcrição, que regulam a morfogênese da cauda a partir da região da margem ventral. Alterações nessas vias causam malformação desde o início do desenvolvimento, podendo ser desde uma cauda ectópica até inexistente e as alterações são facilmente identificáveis antes de 24 hpf^{86,87,88,89}.

Em nossos resultados, as caudas dos animais em que o gene *glb1* foi silenciado apresentaram alterações sutis após 48 hpf, durante a fase inicial a estrutura estava se desenvolvendo normalmente. Essa característica levanta a possibilidade que, talvez, a ausência de β -galactosidase não interfira com as vias que controlam a divisão e diferenciação celular da margem ventral, mas a provável consequente deposição de gangliosídeos GM1 seja a responsável pela piora progressiva da curvatura da cauda.

A avaliação da formação esquelética das larvas foi fundamental por se tratar de um sintoma muito importante da gangliosidose GM1. Foram avaliados animais com 4 e 5 dpf e, nessa fase do desenvolvimento, o esqueleto craniofacial é formado pelo neurocrânio, que tem função de suporte para o cérebro e sistemas sensoriais, e pelo viscerocrânio, que está relacionado aos sistemas respiratório e digestório (alimentação). O viscerocrânio deriva de células da crista neural que formam os sete arcos faríngeos do embrião de *zebrafish*, com vários elementos esqueléticos formados ao longo do eixo dorso-ventral de cada arco^{90,91}.

O primeiro arco, ou mandibular, dá origem às cartilagens de Meckel bilateralmente posicionadas, que se unem na linha média e servem como mandíbula inferior na larva, e as palatoquadradas que se articulam com a extremidade posterior de Meckel para formar a articulação da mandíbula. Os processos pterigoides são extensões anteriores da palatoquadrada que se ligam a placa etmoide, a parte mais anterior do neurocrânio, para formar a mandíbula superior das larvas. Nos animais em que o gene *glb1* foi silenciado todas as cartilagens do primeiro arco apresentaram displasia. O comprimento de cada uma delas

está alterado, provavelmente devido à distribuição das células. A formação das cartilagens de Meckel dificultou a articulação com a palatoquadrada além de apresentar-se achatada na região frontal. A ligação alterada entre palatoquadrada e placa etimoide impede a centralização da placa no sentido longitudinal da larva, comprometendo a formação da mandíbula e da parte anterior do neurocrânio^{92,93}.

Brunt e colaboradores (2015)⁹⁴ demonstraram que as articulações têm plasticidade devido ao fato de não existir atividade muscular na face das larvas até o quarto dia pós fertilização, porém, após esse período a formação das articulações é determinada pela atividade muscular. Em consequência, a diminuição do movimento leva a uma diminuição da distância entre as articulações entre as cartilagens de Meckel e palatoquadradas direita e esquerda.

O segundo arco, ou hioide, também forma duas grandes cartilagens, a hiosimplética e a ceratoial ligando as duas com a articulação hioide. A hiosimplética é formada por uma fusão da hiomandíbula com a haste simplética e se conecta com o neurocrânio por meio da parte anterior da cartilagem ótica e dessa forma segura o esqueleto da mandíbula ao restante do crânio. A displasia das cartilagens do segundo arco apresentada pelos animais microinjetados com MO compromete a ligação entre a hiosimplética e a ceratoial, fazendo com que a última fique projetada no sentido contrário ao que foi observado nos animais controle. Essa alteração provavelmente foi provocada pela desorganização celular somada à diminuição da movimentação das larvas^{92,94}.

Na parte posterior do crânio, os arcos 3 a 7 formam as cartilagens pareadas ventrolateralmente, sendo elas as ceratobranquiais e as hipobranquiais, que tem a função de sustentar os tecidos branquiais densamente ramificados. O quinto par de ceratobrânquios, do sétimo arco, forma vários dentes faríngeos ossificados. O viscerocrânio larval também contém vários ossos diretamente ossificantes, sendo o mais notável o opérculo, que é em forma de leque e se projeta para fora da hiomandíbula dorsal, com função de apoiar e proteger as brânquias^{90,91}. O comprometimento na formação das ceratobranquiais foi o maior de todos. As larvas em que o gene *glb1* foi silenciado não apresentaram essas cartilagens e nem dentes faríngeos.

Nos cinco animais analisados pelo teste de *alcian blue*, a deformidade apresentada nos MO levaram a um posicionamento anormal dos ossos do opérculo, que até essa fase do desenvolvimento não apresentaram alterações morfológicas.

O gene *glb1* do zebrafish não está associado a nenhum processo de formação óssea ou cartilaginosa. Geralmente o produto desse gene, a enzima β -galactosidase, está associada à degradação de macromoléculas (glicosaminoglicanos e esfingolipídeos) e metabolismo de lipídeos, lipoproteínas e galactose (www.nlm.nih.gov/gene). Esses resultados podem indicar correspondência à face infiltrada e à disostose múltipla observada nos pacientes com gangliosidose GM1¹⁸. Até o momento, nenhum modelo animal, para essa doença, manipulável em laboratório apresentou alterações no desenvolvimento ósseo ao ter o gene *glb1* silenciado.

Além de alterações ósseas, os animais testados provavelmente apresentaram funções neurológicas alteradas. Durante o desenvolvimento inicial, o *zebrafish* exibe dois comportamentos de fuga provocados pelo toque: contrações e natação. As contrações começam às 21 hpf e são caracterizadas por um a três movimentos rápidos e alternados do tronco e da cauda em direção à cabeça em resposta aos estímulos táteis. A natação capaz de impulsionar os embriões para frente pelo comprimento do corpo começa após 27 hpf, aproximadamente⁹⁵.

Os neurônios sensoriais que ativam esses comportamentos se dividem em dois grupos: os neurônios dos gânglios trigeminais, localizados no cerebelo e no tronco encefálico, que transmitem estímulos táteis recebidos na região craniofacial^{96,97} e os neurônios Rohon-Beard (RBs), sensoriais primários, localizados dentro da medula espinhal que transmitem estímulos táteis do tronco e da cauda⁹⁸. Ambos os grupos de neurônios são provavelmente polimodais, uma vez que têm demonstrado exibir expressão diferencial em vários receptores relacionados à propriocepção^{99,100}.

A aplicação de estímulos táteis nos embriões na região frontal evoca uma resposta normal ao toque, observada nos animais controle (Figura 24) e descrita por Pietri e colaboradores (2009)¹⁰¹. Dessa maneira, a conservação da atividade desses grupos neuronais é necessária para a resposta de fuga provocada pelo toque, assim como a ativação do receptor de glutamato do tipo AMPA¹⁰¹.

Como observado na Figura 24, 10 larvas do grupo controle *mismatch* e nove do grupo controle exibiram o comportamento esperado para animais com cinco dpf, enquanto os sete dos 12 animais do grupo microinjetado com MO para silenciamento do gene *glb1* permaneceram praticamente imóveis após o toque. Os animais desse grupo nadaram

previamente quando colocados na placa durante o período de ambientação, porém com um padrão diferente dos animais controle. Apesar da habilidade de nado não estar completamente comprometida, eles não reagiram ao teste. Embora não tenha sido possível avaliar diretamente a transdução sensorial dos neurônios citados, os resultados obtidos sugerem que as propriedades dos neurônios podem ser afetadas pelo silenciamento do gene *glb1* e consequente deposição de gangliosídeo GM1. Outro fator que evidencia esse fato é que durante os 60 minutos de avaliação dentro da câmara *DanioVision* os animais do grupo MO percorreram uma distância muito menor e ficaram uma parte do tempo imóveis, assim como sua velocidade de movimento também foi significativamente menor. Isso pode ter acontecido devido ao atraso no desenvolvimento das larvas com o gene *glb1* silenciado, considerando que larvas mais jovens tendem a ser menos ativas (4 dpf) do que as larvas mais velhas (5 dpf)¹⁰². Além disso, esses animais têm o desenvolvimento da bexiga natatória afetado em consequência do consumo do saco vitelínico anormal. A bexiga tem função muito importante na natação, não se sabe exatamente em que momento tem início o seu desenvolvimento, mas sabe-se que ele é concluído no quinto dia de vida, portanto a partir desse momento as larvas precisam do sistema motor funcional e passam a nadar livremente em todas as direções para conseguir se alimentar¹⁰².

Durante os dois testes comportamentais as larvas com o gene *glb1* silenciado movimentavam-se muito menos que os animais controle. A provável hipotonia apresentada por esses animais poderia ser confirmada pela aproximação da porção distal das cartilagens de Meckel. A atividade muscular é fundamental para o distanciamento correto das cartilagens e formação da estrutura em arco da mandíbula⁹⁴.

Essa hipotonia poderia indicar um comprometimento dos neurônios motores, mas devido a todas as alterações observadas nas larvas é pouco provável que seja realmente provocada por um problema neurológico. Mesmo animais com comprometimento muscular reagem ao teste do toque^{103,104}. Granato e colaboradores (1996)¹⁰⁵ pesquisaram genes que intercedem e controlam os diferentes padrões de locomoção embrionária no *zebrafish*. Assim, descreveram seis mutantes em que a via de resposta ao toque estava prejudicada. Em todos os seis casos, os mutantes podiam nadar, mas não conseguiam reagir ao toque corretamente. Porém, apenas em um deles, o mutante *tnt* (alelo tk57), foi observada a ausência completa de reatividade. O fenótipo comportamental desses animais sugeriu que a parte sensorial da via estava afetada, em vez do sistema motor.

Um único modelo animal não consegue contemplar todos os sinais e sintomas de uma mesma doença como vista em humanos, por isso os resultados encontrados em *zebrafish* complementam a pesquisa da gangliosidose GM1 juntamente com os outros modelos animais estudados até o momento (Tabela 5).

Tabela 5: Sinais e sintomas descritos em pacientes e modelos animais para a gangliosidose GM1.

Sintoma relacionados a gangliosidose GM1	Humano	Gato	Cão	Gado Bovino	Ovelha	Emu	Urso Negro	Camund.	Peixe
Atraso no desenvolvimento	+			+	+				+
Abaulamento frontal	+	+							+
Hipotonia	+								+
Hepatoesplenomegalia	+		+						
Retina edematosa	+			+					
Disfunção motora	+		+	+	+				
Displasia esquelética	+	+							+
Ataxia	+	+				+	+	+	
Alterações de marcha	+					+		+	
Disartria	+								
Disfagia	+								
Crises eplépticas	+								
Tremor						+	+		
Hemiparesia								+	
Letargia							+		

Até o momento o *zebrafish* tem se apresentado como um futuro modelo animal válido para o estudo da β -galactosidase, mas apesar dos bons resultados obtidos pesquisas maiores ainda são necessárias para um conhecimento mais completo com relação à doença nesse modelo animal.

6. Conclusões

- No presente trabalho foi possível realizar o silenciamento temporário do gene *glb1* em *zebrafish* com a técnica de morfolino, que inibiu temporariamente a produção da enzima β -galactosidase em *zebrafish*.
- Foi possível observar um comprometimento ósseo e cartilaginoso durante a fase inicial do desenvolvimento que até o momento não tinha sido observado em outro modelo animal manipulável em laboratório para a gangliosidose GM1.
- Os animais apresentaram comprometimento no desenvolvimento e características fenotípicas morfológicas (abaulamento frontal, extensão diferenciada do saco vitelínico e malformação de cauda) e funcional (menor mobilidade). Tal alteração de mobilidade indica comprometimento neurológico, porém o tema ainda precisa ser melhor estudado.

7. Referências

1. Clarke JTR. A clinical guide to inherited metabolic diseases. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2006.
2. Vernon, HJ. Inborn Errors of Metabolism: Advances in Diagnosis and Therapy. JAMA Pediatr. 2015; doi:10.1001/jamapediatrics.2015.0754.
3. Deodato F, Boenzi S, Rizzo C, Abeni D, Caviglia S, Picca S, et al. Inborn errors of metabolism: an update on epidemiology and on neonatal-onset hyperammonemia. Acta Paediatr Suppl. 2004; 93(445):18-21.
4. Saudubray JM, Sedel F, Walter JH. Clinical approach to treatable inborn metabolic diseases: An introduction. J Inher Metab Dis. 2006; 29:261-74.
5. Valayannopoulos V, Verhoeven NM, Mention K, Salomons GS, Sommelet D, Gonzales M, et al. Transaldolase deficiency: a new cause of hydrops fetalis and neonatal multi-organ disease. J Pediatr. 2006; 149(5):713-7.
6. Platt FM, Boland B, van der Spoel AC. The cell biology of disease: lysosomal storage disorders: the cellular impact of lysosomal dysfunction. J Cell Biol. 2012; 199(5):723-34.
7. Fraldi A, Klein AD, Medina DL, Settembre C. Brain disorders due to lysosomal dysfunction. Annu Rev Neurosci. 2016. DOI: 10.1146/annurev-neuro-070815-014031.
8. Boustany RM. Lysosomal storage diseases: the horizon expands. 2013; 9(10):583-98.
9. Hers HG. alpha-Glucosidase deficiency in generalized glycogen storage disease (Pompe's disease). Biochem J. 1963; 86:11-16
10. Winchester B. Primary defects in lysosomal enzymes in Lysosomal disorders of the brain. Oxford: Oxford University Press, 2004.
11. Siegel DA, Walkley SU. Growth of ectopic dendrites on cortical pyramidal neurons in neuronal storage diseases correlates with abnormal accumulation of GM2 ganglioside. J Neurochem. 1994; 62(5):1852-62.

12. March PA, Thrall MA, Brown DE, Mitchell TW, Lowenthal AC, Walkley SU. GABAergic neuroaxonal dystrophy and other cytopathological alterations in feline Niemann-Pick disease type C. *Acta Neuropathol.* 1997; 94(2):164-72.
13. Micsenyi MC, Dobrenis K, Stephney G, Pickel J, Vanier MT, Slaugenhaupt SA, Walkley SU. Neuropathology of the Mcolm1(-/-) knockout mouse model of micolipidosis type IV. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2009; 68(2):125-35.
14. Jardim LB, Villanueva MM, de Souza CF, Netto CB. Clinical aspects of neuropathic lysosomal storage disorders. *J Inherit Metab Dis.* 2010; 33(4):315-29.
15. Pastores GM, Maegawa GH. Clinical neurogenetics: neuropathic lysosomal storage disorders. *Neurol Clin.* 2013; 31(4):1051-71.
16. Brunetti-Pierri N, Scaglia F. GM1 gangliosidosis: Review of clinical, molecular, and therapeutic aspects. *Mol Genet Metab.* 2008;94:391-6.
17. Baiotto C, Sperb F, Matte U, Silva CD, Sano R, Coelho JC, Giugliani R. Population analysis of the GLB1 gene in South Brazil. *Genet Mol Biol.* 2011; 34(1): 45-48.
18. Suzuki Y, Nanba E, Matsuda J, Higaki K, Oshima A. β -galactosidase deficiency (β -galactosidosis): GM1 gangliosidosis and Morquio B disease in *The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*(eds Valle D, Beaudet AL, Vogelstein B, Kinzler KW, Antonarakis SF, Ballabio A) Chapter 151 (2013), McGraw-Hill, New York, USA.
19. Ledeen RW, Yu RK. Gangliosides: structure, isolation, and analysis. *Methods Enzymol.* 1982; 83:139-91.
20. Mocchetti I. Exogenous gangliosides, neuronal plasticity and repair, and the neurotrophins. *Cell Mol Life Sci.* 2005; 62(19-20):2283-94.
21. Hakomori S. Bifunctional role of glycosphingolipids. *J Biol Chem.* 1990; 255(31): 18713-16.

22. Aureli M, Mauri L, Ciampa MG, Prinetti A, Toffano G, Secchieri C, Sonnino S. GM1 ganglioside: past studies and future potential. *Mol Neurobiol.* 2016 53(3):1824-42.
23. Rahmann H. Brain gangliosides and memory formation. *Behav Brain Res.* 1995; 66(1-2):105-16.
24. Silva CM, Severini MH, Sopelsa A, Coelho JC, Zaha A, d'Azzo A, Giugliani R. Six novel beta-galactosidase gene mutations in Brazilian patients with GM1 gangliosidosis. *Hum Mutat.* 1999; 13(5):401-9.
25. Sinigerska I, Chandler D, Vaghjiani V, Hassanova I, Gooding R, Morrone A, et al. Founder mutation causing infantile GM1 gangliosidosis in the Gypsy population. *Mol Genet Metab.* 2006; 88(1):93-5.
26. Hachiya Y, Hayashi M. An 11-year-old boy showing rapid psychomotor regression and diffuse cerebral white matter lesions. *Neuropathology.* 2009; 29(4):517-9.
27. Hofer D, Paul K, Fantur K, Beck M, Bürger F, Caillaud C, et al. GM1 gangliosidosis and Morquio B disease: expression analysis of missense mutations affecting the catalytic site of acid beta-galactosidase. *Hum Mutat.* 2009; 30(8):1214-21.
28. Kannebley JS, Silveira-Moriyama L, Bastos LO, Steiner CE. Clinical findings and natural history in ten unrelated families with juvenile and adult GM1 gangliosidosis. *JIMD Rep.* 2015; 24:115-22.
29. Caciotti A, Donati MA, d'Azzo A, Salvioli R, Guerrini R, Zammarchi E, Morrone A. The potential action of galactose as a "chemical chaperone": increase of beta galactosidase activity in fibroblasts from an adult GM1-gangliosidosis patient. *Eur J Paediatr Neurol.* 2009 13(2):160-4.
30. Caciotti A, Bardelli T, Zammarchi E, Morrone A, Cunningham J, d'Azzo A. Modulating of the new polymorphism L436F detected in the GLB1 gene of atype-II GM1 gangliosidosis patient. *Hum Genet.* 2003, 113(1):44-50.

31. Wager K, Mahmood F, Russel C. Modelling inborn errors of metabolism in zebrafish. *J Inherit Metab Dis*. 2014; 37 (4):483-95.
32. Sperb F, Vairo F, Burin M, Mayer FQ, Matte U, Giugliani R. Genotypic and phenotypic characterization of Brazilian patients with GM1 gangliosidosis. *Gene*. 2013; 512:113-6.
33. Karimzadeh P, Naderi S, Modarresi F, Dastsooz H, Nemati H, Farokhashtiani T, et al. Case reports of juvenile GM1 gangliosidosis type II caused by mutation in GLB1 gene. *BMC Med Genet*. 2017; 18(1):73. doi: 10.1186/s12881-017-0417-4.
34. Baptista MB, Scherrer DZ, Bonadia LC, Steiner, CE. Molecular analysis of nine unrelated families presenting with juvenile and chronic GM1 gangliosidosis. *Journal of Inborn Errors of Metabolism and Screening*. 2016; 4:1-5. doi: 10.1177/2326409816643098
35. D'Azzo A, Hoogeveen A, Reuser AJJ, Robinson D, Galjaard H. Molecular defect in combined β -galactosidase and neuraminidase deficiency in man. *Biochemistry*. 1982; 79: 4535-9.
36. Yang CF, Wu JY, Tsai FJ. Three novel beta-galactosidase gene mutations in Han Chinese patients with GM1 gangliosidosis are correlated with disease severity. *Journal of Biomedical Science*. 2010, 17(1):79-86.
37. Callahan JW. Molecular basis of GM1 gangliosidosis and Morquio disease, type B. Structure-function studies of lysosomal β -galactosidase and the nonlysosomal β -galactosidase-like protein. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1999, 1455:85-103.
38. Santamaria A, Chabás A, Coll MJ, Miranda CS, Vilageliu V, Grinberg D. Twenty-one novel mutations in the GLB1 gene identified in a large group of GM1-gangliosidosis and Morquio B patients: possible common origin for the prevalent p.R59H mutation among gypsies. *Hum Mutat*. 2006, 27:1-11.
39. Giugliani R, Jackson M, Skinner SJ, Vimal CM, Fensom AH, Fahmy N, et al. Progressive mental regression in siblings with Morquio disease type B (mucopolysaccharidosis IV B). *Clin Genet*. 1987; 32(5):313-25.

40. Jatzkewitz H, Sandhoff K. On a biochemically special form of infantile amaurotic idiocy. *Biochim Biophys Acta*. 1963; 70:354-6.
41. O'Brien JS, Stern MB, Landing BH, O'Brien JK, Donnell GN. Generalized gangliosidosis: another inborn error of ganglioside metabolism? *Am J Dis Child*. 1965; 109:338-46.
42. O'Brien JS, Storb R, Raff RF, Harding J, Appelbaum F, Morimoto S, et al. Bone marrow transplantation in canine GM1 gangliosidosis. *Clin Genet*. 1990; 38(4):274-80.
43. Blakemore WF. GM1 gangliosidosis in a cat. *J Comp Pathol*. 1972; 82(2):179-85.
44. Read DH, Harrington DD, Keenana TW, Hinsman EJ. Neuronal-visceral GM1 gangliosidosis in a dog with beta-galactosidase deficiency. *Science*. 1976; 194(4263):442-5.
45. Donnelly WJC, BJ Sheahan. GM1 gangliosidosis of Friesian calves: A review. *Irish VetJ*. 1981; 35:45-55.
46. Prieur DJ, Ahern-Rindell AJ, Murnane RD. Ovine GM1 gangliosidosis. *Am J Pathol*. 1991; 139(6):1511-3.
47. Skelly BJ, Jeffrey M, Franklin RJ, Winchester BG. A new form of ovine GM1-gangliosidosis. *Acta Neuropathol*. 1995; 89(4):374-9.
48. Bermudez AJ, Johnson GC, Vanier MT, Schröder M, Suzuki K, Stogsdill PL, et al. Gangliosidosis in emus (*Dromaius Novaehollandiae*). *Avian Dis*. 1995; 39(2):292-303.
49. Muthupalani S, Torres PA, Wang B, Zeng BJ, Eaton S, Erdely I, et al. GM1 gangliosidosis in American black bears: clinical, pathological, biochemical and molecular genetic characterization. *Mol Genet Metab*. 2014; 111(4):513-21.
50. Hahn CN, de Pilar Martin M, Schröder M, Vanier MT, Hara Y, Suzuki K, et al. Generalized CNS disease and massive GM1-ganglioside accumulation in mice defective in lysosomal acid beta-galactosidase. *Hum Mol Genet*. 1997; 6(2):205-11.
51. Seth A, Stemple DL, Barroso I. The emerging use of zebrafish to model metabolic disease. *Dis Model Mech*. 2013; 6 (5):1080-8.

52. Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berrthelot C, Muffato M, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*. 2013; 496 (7446): 498-503.
53. Löhr H, Hammerschmidt M. Zebrafish in endocrine systems: recent advances and implications for human disease. *Annu Rev Physiol*. 2011; 73:183-211.
54. Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nat Rev Genet*. 2010; 11:181–90.
55. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013; 339:819–23.
56. Mahmood F, Fu S, Cooke J, Wilson SW, Cooper JD, Russell C. A zebrafish model of CLN2 disease is deficient in tripeptidyl peptidase 1 and displays progressive neurodegeneration accompanied by a reduction in proliferation. *Brain*. 2013; 136(Pt5):1488-507.
57. Zancan I, Bellesso S, Costa R, Salvaio M, Stroppiano M, Hammond C, et al. Glucocerebrosidase deficiency in zebrafish affects primary bone ossification through increased oxidative stress and reduced Wnt/ β -catenin signaling. *Hum Mol Genet*. 2015; 24(5):1280-94.
58. Heasman J, Kofron M, Wylie C. Beta-catenin signaling activity dissected in the early *Xenopus* embryo: a novel antisense approach. *Dev Biol*. 2000; 222(1):124-34.
59. Blum M, De Robertis EM, Wallingford JB, Niehrs C. Morpholinos: Antisense and Sensibility. *Dev Cell*. 2015; 35(2):145-9.
60. Kok FO, Shin M, Gupta A, Grosse AS, van Impel A, Kirchmajer BC, et al. Reverse genetic screening reveals poor correlation between morpholino-induced and mutant phenotypes in zebrafish. *Dev Cell*. 2015; 32(1): 97-108.
61. Hardy S, Legagneux V, Audic Y, Paillard L. Reverse genetics in eukaryotes. *Biol Cell*. 2010; 102(10):561-80.

62. Chitramuthu BP, Baranowski DC, Kay DG, Bateman A, Bannett HP. Progranulin modulates zebrafish motoneuron development in vivo and rescues truncation defects associated with knockdown of survival motor neuron 1. *Mol Neurodegener.* 2010; 5:41.
63. Laird AS, Van Hoecke A, De Muynck L, Timmers M, Van den Bosch L, Van Damme P, Robberecht W. Progranulin in neurotrophic in vivo and protects against a mutant TDP-43 induced axonopathy. *PLoS One.* 2010; 5(10):e13368
doi: 10.1371/journal.pone.0013368.
64. Follo C, Ozzano M, Mugoni V, Castino R, Santoro M, Isidoro C. Knock-Down of Cathepsin D Affects the Retinal Pigment Epithelium, Impairs SwimBladder Ontogenesis and Causes Premature Death in Zebrafish. *PLoS One.* 2011; 6(7):e21908.
doi:10.1371/journal.pone.0021908
65. Moro E, Tomanin R, Friso A, Modena N, Tiso N, Scarpa M, Argenton F. A novel functional role of iduronate-2-sulfatase in zebrafish early development. *Matrix Biol.* 2010; 29(1):43-50.
66. Wraith JE. Lysosomal disorders. *Semin Neonatol.* 2008; 7(1):75-83.
67. Flanagan-Steet H, Sias C, Steet R. Altered chondrocyte differentiation and extracellular matrix homeostasis in a zebrafish model for mucopolidosis II. *Am J Pathol.* 2009; 175(5):2063-2075.
68. Schwend T, Loucks EJ, Snyder D, Ahlgren SC. Requirement of Npc1 and availability of cholesterol for early embryonic cell movements in zebrafish. *J Lipid Res.* 2011; 52(7):1328-44.
69. Aken BL, Ayling S, Barrell D, Clarke L, Curwen V, Fairley S, et al. The Ensembl gene annotation system. *Database (Oxford).* doi: 10.1093/database/baw093.
70. Westerfield, M. The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). 4th ed. Oregon: University of Oregon Press, 2000.

71. Ekker SC, Larson JD. Morphant technology in model developmental systems. *Genesis*. 2001; 30: 89–93.
72. Robu ME, Larson JD, Nasevicius A, Beiraghi S, Brenner C, Farber SA, Ekker SC. p53 activation by knockdown technologies. *PLoS Genet*. 2007; 3(5): e78. doi:10.1371/journal.pgen.0030078.
73. Bedell VM, Westcot SE, Ekker SC. Lessons from morpholino-based screening in zebrafish. *Brief Funct Genomics*. 2011, 4(10): 181-188.
74. Bill BR, Petzold AM, Clark KJ, Schimmenti LA, Ekker SC. A primer for morpholino use in zebrafish. *Zebrafish*. 2009, 1(6): 69-77.
75. Fan X, Klein M, Flanagan-Steet HR, Steet R. Selective yolk deposition and mannose phosphorylation of lysosomal glycosidases in zebrafish. *J Biol Chem*. 2010; 285(43):32946-53.
76. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry*. 7th ed. New York: WH Freeman and Company; 2012.
77. Thisse C, Thisse B. High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nat Protoc*. 2008;3(1):59-69.
78. Scott JE, Dorling J. Differential staining of acid glycosaminoglycans (mucopolysaccharides) by alcian blue in salt solutions. *Histochemie*. 1965; 5(3):221-33.
79. Solomon KS, Kudoh T, Dawid IB, Fritz A. Zebrafish foxi1 mediates otic placode formation and jaw development. *Development*. 2003; 130(5):929-40.
80. Walker MB, Kimmel CB. A two-color acid-free cartilage and bone stain for zebrafish larvae. *Biotech Histochem*. 2007; 82:23-28.
81. Wallace RA, Opresko L, Wiley HS, Selman K. The oocyte as an endocytic cell. *Ciba Found Symp*. 1983; 98:228-48.

82. Fagotto F. Regulation of yolk degradation, or how to make sleepy lysosomes. *J Cell Sci.* 1995; 108(12):3645-7.
83. Uddin MM, Tanimoto T, Yakubi A, Kotani T, Kuwamura M, Chang HS, Yamato O. Mutation analysis of GM1 gangliosidosis in a Siamese cat from Japan in the 1960s. *J Feline Med Surg.* 2012; 14(12):900-2.
84. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn.* 1995; 203(3): 253 - 310.
85. Kanki JP, Ho RK. The development of the posterior body in zebrafish. *Development.* 1997; 124(4):881-93.
86. Schier AF, Talbot WS. Molecular genetics of axis formation in zebrafish. *Annu Rev Genet.* 2005; 39: 561-613.
87. Mullins MC, Hammerschmidt M, Kane DA, Odenthal J, Brand M, van Eeden FJ, et al. Genes establishing dorsoventral pattern formation in the zebrafish embryo: the ventral specifying genes. *Development.* 1996; 123:81-93.
88. Kishimoto Y, Lee KH, Zon L, Hammerschmidt M, Schulte-Merker S. The molecular nature of zebrafish swirl: BMP2 function is essential during early dorsoventral patterning. *Development.* 1997; 124(22):4457-66.
89. Yang Y, Thorpe C. BMP and non-canonical Wnt signaling are required for inhibition of secondary tail formation in zebrafish. *Development.* 2011; 138(12): 2601-11.
90. Cubbage CC, Mabee PM. Development of the Cranium and Paired Fins in the Zebrafish *Danio rerio* (Ostariophysi, Cyprinidae). *J Morphol.* 1996; 229: 121–60.
91. Piotrowski T, Schilling TF, Brand M, Jiang YJ, Heisenberg CP, Beuchle D, et al. Jaw and branchial arch mutants in zebrafish. II. Anterior arches and cartilage differentiation. *Development.* 1996; 123: 345–56.
92. Schilling TF. Genetic analysis of craniofacial development in the vertebrate embryo. *Bio Essays.* 1997; 19: 459–468.

93. Schilling TF, Kimmel CB. Segment and cell type lineage restrictions during pharyngeal arch development in the zebrafish embryo. *Development*. 1994; 120: 483–494.
94. Brunt LH, Norton JL, Bright JA, Rayfield EJ, Hammond CL. Finite element modelling predicts changes in joint shape and cell behaviour due to loss of muscle strain in jaw development. *J Biomech*. 2015; 48(12):3112-22.
95. Saint-Amant L, Drapeau P. Time course of the development of motor behaviors in the zebrafish embryo. *J Neurobiol*. 1998; 37(4):622-32.
96. Drapeau P, Saint-Amant L, Buss RR, Chong M, Mcdearmid JR, Brustein E. Development of the locomotor network in zebrafish. *Prog Neurobiol*. 2002; 68(2):85-111.
97. Sneddon LU. Trigeminal somatosensory innervation of the head of a teleost fish with particular reference to nociception. *Brain Res*. 2003; 972(1-2):44-52.
98. Clarke JD, Hayes BP, Hunt SP, Roberts A. Sensory physiology, anatomy and immunohistochemistry of Rohon-Beard neurones in embryos of *Xenopus laevis*. *J Physiol*. 1984; 348: 511-25.
99. Kucenas S, Li Z, Cox JA, Egan TM, Voigt MM. Molecular characterization of the zebrafish P2X receptor subunit gene family. *Neuroscience*. 2003; 121(4):935-45.
100. Cockayne DA1, Dunn PM, Zhong Y, Rong W, Hamilton SG, Knight GE, et al. P2X2 knockout mice and P2X2/P2X3 double knockout mice reveal a role for the P2X2 receptor subunit in mediating multiple sensory effects of ATP. *J Physiol*. 2005 Sep 1; 567(Pt 2):621-39.
101. Pietri T, Manalo E, Ryan J, Saint-Amant L, Washbourne P. Glutamate drives the touch response through a rostral loop in the spinal cord of zebrafish embryos. *Dev Neurobiol*. 2009; 69(12):780-95
102. Colwill RM, Creton R. Locomotor behaviors in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Behav Processes*. 2011; 86(2):222-9.

103. Gleason MR, Armisen R, Verdecia MA, Sirotkin H, Brehm P, Mandel G. A mutation in *serca* underlies motility dysfunction in accordion zebrafish. *Dev Biol.* 2004; 276(2):441-51.
104. Hirata H, Saint-Amant L, Waterbury J, Cui W, Zhou W, Li Q, et al. Accordion, a zebrafish behavioral mutant, has a muscle relaxation defect due to a mutation in the ATPase Ca^{2+} pump *serca1*. *Development.* 2004; 131(21):5457-68.
105. Granato M, van Eeden FJ, Schach U, Trowe T, Brand M, Furutani-Seiki M, et al. Genes controlling and mediating locomotion behavior of the zebrafish embryo and larva. *Development.* 1996; 123:399-413.

8. Anexos



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Gangliosidose GM1: proposta de estudo em modelo animal utilizando o *Danio rerio*" (protocolo nº 3092-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Cláudia Vianna Maurer Morelli / Marcella Bergamini De Baptista, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 03 de junho de 2013.

Campinas, 03 de junho de 2013.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guarnido
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada Gangliosidose GM1: proposta de estudo em modelo animal utilizando o Danio rerio, registrada com o nº 3092-1(A)/2017, sob a responsabilidade de Profa. Dra. Cláudia Vianna Maurer Morelli / Marcella Bergamini De Baptista, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em 20 de junho de 2017.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	27/06/2017-30/09/2017
Vigência da autorização para manipulação animal:	27/06/2017-30/09/2017
Espécie / linhagem/ raça:	Peixe / Danio rerio
No. de animais:	30
Peso / Idade:	05 dias / 01g
Sexo:	Machos
Origem:	CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 20 de junho de 2017.

Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.