1. **OBJETIVOS**

**2.1 Objetivo Geral**

**-** Estudar os efeitos do ácido valproico e da vitamina E na toxicidade induzida por cisplatina no sistema nervoso central.

**2.2 Objetivos Específicos**

-Verificar as alterações comportamentais causadas aos animais pela administração de cisplatina e a prevenção e/ou reversão destas pelo uso do ácido valproico e da vitamina E;

-Determinar as alterações em parâmetros de estresse oxidativo como: atividade de SOD, glutationa reduzida, peroxidação lipídica e peroxinitrito no hipocampo, córtex pré-frontal e córtex temporal;

-Determinar os níveis de acetilcolinesterase no hipocampo, córtex pré-frontal e córtex temporal;

-Avaliar as alterações em mecanismos de neuroplasticidade como: níveis de BDNF, fosfo-Ser9-GSK3 em animais tratados com ácido valproico na toxicidade induzida por cisplatina;

-Avaliar as alterações inflamatórias e anti-inflamatórias como: IL-1β, TNFα, e IL10 em animais tratados com ácido valproico ou vitamina E na toxicidade induzida por cisplatina.

-Marcar por imunofluorescência os marcadores GFAP e Fosfocreb, NFκB e NeuN no hipocampo, Iba-1e iNOS em animais tratados com ácido valproico ou vitamina E na toxicidade induzida por cisplatina.

-Quantificar por PCR a expressão gênica das enzimas iNOS e AChE em animais tratados com ácido valproico ou vitamina E na toxicidade induzida por cisplatina.

1. **MATERIAIS E MÉTODOS**

**3.1 Animais**

Os experimentos serão realizados em ratos Wistar machos adultos (peso: 250-300 g), obtidos no biotério central da Universidade Federal do Ceará (UFC) sempre no mesmo horário, no caso dos experimentos comportamentais entre 10:00 e 16:00. Serão utilizados 8 animais por grupo, sendo os mesmos divididos e mantidos em caixas de acordo com seus respectivos tratamentos, com um ciclo claro/escuro de 12 h, água e ração animal *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais serão realizados de acordo com diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) já tendo sido aprovado pelo comitê de ética em pesquisa animal (CEPA-UFC).

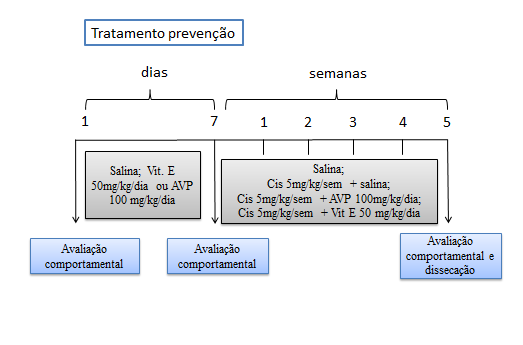
**3.2. Drogas**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Droga** | **Preparo** | **Via de administração** |
| Cisplatina (Platistine®) | Solução injetável | Via intraperitoneal (IP) |
| Ácido Valproico (DEPAKENE®) | Xarope | Via oral |
| Vitamina E | Xarope | Via intraperitoneal |

**3.3 Tratamento**

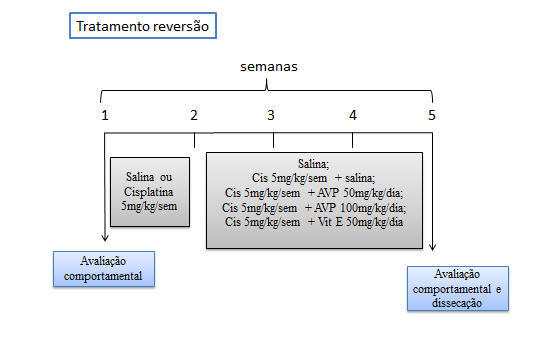
Serão feitos dois tipos de protocolos: prevenção e reversão. No primeiro, será realizado o pré-tratamento com ácido valproico e/ou vitamina E durante sete dias e posteriormente iniciará o tratamento com cisplatina (5mg/kg/semana) durante cinco semanas concomitante com o tratamento com ácido valproico ou vitamina E. No segundo será realizado o tratamento com cisplatina (5mg/kg/semana) durante cinco semanas consecutivas, tratamento no qual induz os sintomas neurotóxicos por cisplatina no cérebro (CHTOUROU et. al, 2015), na segunda semana será iniciado tratamento com ácido valproico e/ou vitamina E. As doses de ácido valproico foram baseadas em estudos anteriores (XIMENES et. al,2015; CHU et.al, 2015) e a dose da vitamina E foi escolhido através da conversão de dose recomendada diária para adultos humanos (REAGAN-SHAW et al, 2007) ) para a dose equivalente em ratos ( ). Cada grupo será constituído por oito animais. Os animais serão tratados conforme o esquema abaixo:

**Figura 1:** Esquema tratamento de prevenção



Fonte: próprio autor

**Figura 2:** esquema de tratamento de reversão

****

Fonte: próprio autor

Os estudos comportamentais serão avaliados 30 minutos antes do início do tratamento com as drogas, no 7º dia (tratamento prevenção) e no último dia de tratamento em ambos os protocolos de tratamento, individualmente 2 h após a última administração, de maneira que o comportamento de cada animal servirá para comparação com ele próprio, desta forma será possível acessar os efeitos do tratamento comparando com o 1º dia de tratamento e se as drogas estão sendo eficazes, caso-a-caso. Os camundongos serão sacrificados por decapitação imediatamente após as determinações comportamentais e as áreas cerebrais serão dissecadas (hipocampo, córtex pré-frontal córtex temporal), rapidamente congeladas e armazenadas a -70° C até a análise bioquímica.

**3.4 Estudo dos efeitos comportamentais**

**3.4.1 Campo Aberto**

O presente experimento é utilizado para avaliar a atividade exploratória do animal (ARCHER, 1973). Os animais serão colocados em um campo aberto, com área de 50 x 50 cm. Previamente, serão habituados durante 1 minuto ao campo aberto e, posteriormente, submetidos ao teste durante 5 minutos. O parâmetro para observação será o número de cruzamentos com as quatro patas (movimentação espontânea ou atividade locomotora espontânea/ALE), registrados durante um período de 5 minutos.

**3.4.2 Reconhecimento de objeto novo (NOR)**

O teste de reconhecimento do objeto novo é baseado na avaliação das diferenças de tempo de exploração de objetos novos e familiares. Embora parâmetros como atenção e ansiedade também possam ser avaliados por esse teste (GOULART et al., 2010; SILVERS et al., 2007) , ele tem sido amplamente utilizado para investigação de alterações na memória, sobretudo no que diz respeito à memória de reconhecimento, e para esse fim será utilizado nesse estudo. Além disso, nos deteremos na avaliação da memória de reconhecimento de curta duração.

O teste consiste em três etapas: habituação, familiarização e fase teste executadas de acordo com ENNACEUR E DELACOUR et al.(1988) e adaptadas por Taglialatela et al. (2009), que serão discriminadas a seguir.

Cada animal será, primeiramente, habituado em um arena de campo aberto vazia de dimensões 300 x 300 mm, com paredes 150 mm de altura e feita material acrílico transparente. Essa etapa consistirá de duas sessões de 10 minutos de duração, separadas entre si por um intervalo de 24 horas. Após 24 horas da última sessão de habituação, os animais serão submetidos à fase de familiarização, na qual serão expostos a dois objetos idênticos, denominados de objetos familiares, por tempo suficiente para que tenham todos 20 segundos de exploração desse objeto, após o qual essa fase encerra. Nesse contexto, Ennanceur e Delacour (1988) definiram como exploração o direcionamento do focinho para o objeto a uma distância de 2 cm ou menos dele, como também tocá-lo com o focinho ou cheirá-lo. Depois disso, os animais retornarão para suas caixas moradia e, após um período de 2 minutos, eles retornaram para a arena, na qual dois objetos, um idêntico ao familiar (mas não previamente usado) e outro novo. Assim, será permitido aos animais explorarem o ambiente por 10 minutos, durante o qual a quantidade de tempo explorando cada objeto será registrada. Os objetos familiar e novo serão alternados de posição para cada animal testado, e os objetos e a arena serão limpos com álcool 70-75% entre os ensaios.

Ademais, o índice aferido nesse teste será o percentual de tempo explorando cada objeto (familiar versus novo), reportado como taxa de discriminação de objeto, e será calculado pela seguinte fórmula:

(Tempo explorando o objeto específico/ tempo total usado na fase teste -10 min) x 100

**3.4.3. Y maze**

Para avaliação da memória de trabalho será utilizado o teste de labirinto em Y, sendo conduzido conforme descrito previamente (YAMADA et al., 1996). O labirinto em Y é constituído de três braços idênticos (40 cm de comprimento, 25 cm de altura e 6 cm de largura), dispostos a 120o um do outro, formando um triângulo central (Figura 10). Os animais serão colocados em um dos braços e a sequência das entradas nos braços será registrada durante oito minutos. A alternância será definida como a entrada nos três braços, em qualquer ordem, sem que houvesse repetição dos braços (por exemplo, 123, 321, 231). Após o teste, os animais serão devolvidos às suas caixas-moradia e realizar-se-á a assepsia do labirinto em Y com álcool etílico a 15% entre um animal e outro.

A porcentagem de alternância será calculada como a soma do número de alternâncias dividida pelo número total de entradas nos braços menos dois. Esses valores foram aplicados na fórmula a seguir: % de alternância corretas = soma de alternâncias/nº de entradas totais -2.

**3.5. Estudos neuroquimicos**

* + 1. **Dosagem da superóxido dismutase (SOD)**

A quantidade da enzima superóxido dismutase (SOD) será avaliada medindo-se sua capacidade de inibir a redução fotoquímica do azul de nitro-bluetetrazolio (NBT). Os homogenatos das áreas cerebrais preparados em tampão fosfato, serão misturados em 1 mL do meio de reação (tampão fosfato 50mM, EDTA 100nM e L-metionina 13mM pH 7,8), 150 uL do NBT 75 uL e 300 uL riboflavina 2 uL numa câmara escura. Os tubos contendo a solução obtida serão expostos a lâmpadas fluorescentes (15 W) por 15 minutos. Ao término do tempo o material será lido em espectofotômetro 560nm. Os resultados serão expressos em unidades da enzima, que é a quantidade de SOD necessária para inibir a taxa de redução do NBT em 50 %.

**3.5.2 Determinação da concentração de glutationa reduzida (GSH)**

Os homogenatos das áreas cerebrais serão adicionados a ácido tricloroacético a 50%, agitados e centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos. Em seguida o sobrenadante será recolhido e acrescido de tampão Tris-HCl 0,4M, pH 8,9 e DTNB 0,01M. Após 1 minuto da reação, a leitura será feita em leitor de placas em 412nm. A concentração de glutationa reduzida será expressa em ng de GSH/g de tecido, tendo por base uma curva padrão.

**3.5.3 Avaliação da peroxidação lipídica (dosagem de malonildialdeído)**

Serão preparados homogenatos das áreas cerebrais a 10% em solução de cloreto de potássio (KCl) 1,15 %. 0,25 mL do homogeneizado será misturado a 1 mL de solução de ácido tricloroacético a 10% e acrescido de 1 mL de solução de ácido tiobarbitúrico 0,6%. Após a agitação, essa mistura foi mantida em um banho de água fervente (95-100°C) por 15 minutos, adicionado o n-butanol (2:1 v/v), a seguir resfriada em banho de gelo por alguns minutos e posteriormente centrifugada (800xg, 5 min). O conteúdo de TBARS será determinado em espectrofotômetro a 535 nm. Os resultados serão expressos em micromol de malonildialdeído (MDA)/g de tecido.

**3.5.4 Determinação dos níveis de nitrito**

A concentração de nitrito será determinada segundo o método de GREEN e colaboradores (1981), que se baseia em revelar a presença de nitrito em uma amostra (sobrenadante celular, urina, plasma ou homogenato tecidual) por uma reação de diazotação que forma um cromóforo de cor rósea, com pico de absorbância de 560 nm. Para esta experiência 100 L do reativo de Griess (sulfanilamida a 1%/ cloridrato de N-(1-naftil)-etilenediamina 0.1% / H3PO4 em 1% / água destilada, na proporção de 1:1:1:1) será adicionado a 100 L do sobrenadante da cultura de célula e incubado a temperatura ambiente por 10 min. A curva padrão será elaborada com várias concentrações de NaNO2 (variando de 0,75 à 100 M) sob as mesmas condições. Os brancos serão preparados pela adição de 100 L do reativo de Griess a 100 L do meio de cultura e a absorbância será medida em leitor de microplacas em 560 nm.

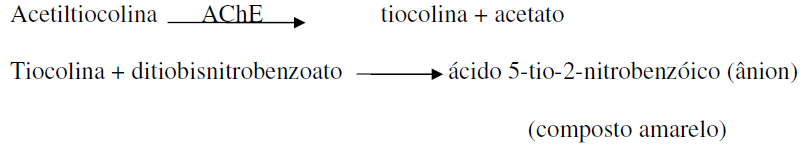
**3.5.5 Liberação da enzima Mieloperoxidase (MPO) em neutrófilos humanos**

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima contida nos grânulos primários dos neutrófilos. Mais de 95% da MPO está presente nos grânulos dos neutrófilos, existindo os restantes 5% nos monócitos circulantes. Esta enzima catalisa a oxidação de substâncias na presença de peróxido de hidrogênio (H2O2) e de um halogênio, constituindo a ligação peróxido de hidrogênio-halogênio-MPO um sistema altamente tóxico para os microorganismos. Segundo Lucisano e Mantovani (1984), 2.5 x 106 de leucócitos humanos, obtidos segundo descrição no item anterior, foram suspensos e tamponados com solução balanceada de Hanks, contendo cálcio e magnésio. As preparações continham predominantemente neutrófilos (85.0 ± 2.8%) e a viabilidade das células foi determinada pelo Teste de Trypan azul, 97.7 ± 0.94%. As células foram incubadas com os óleos essenciais (0.01, 0.1 e 1 µg/ml) por 15 minutos numa temperatura de 37ºC. Os neutrófilos humanos foram estimulados pela adição de acetato de miristato de forbol (PMA, 0.1 µg/mL) por 15 minutos numa temperatura de 37ºC. A suspensão foi centrifugada por 10 min, 2.000 g em 4ºC. Alíquotas (50 µL) do sobrenadante foram adicionadas a salina tampão-fosfato (100 µL), tampão-fosfato (50 µL, pH 7.0) e H2O2 (0.012%). Após 5 minutos numa temperatura de 37ºC, tetrametil benzidina (1.5 mM, 20 µL) foi adicionado e a reação foi interrompida pela adição de 30 µL de acetato de sódio (1.5 M, pH 3.0). A absorbância foi determinada em 620 nm.

**3.5.6 Determinação da Atividade da Acetilcolinesterase (AChE)**

A atividade acetilcolinesterásica (AChE) será determinada a 25 ºC e pH 8,0, de acordo com o método de Ellman *et al.,* (1961), que tem como princípio a medida da velocidade de produção da tiocolina à proporção que a acetiltiocolina (ATC), utilizada como substrato, é hidrolisada. Isto é acompanhado pela reação contínua do tiol com o íon 5:5’-ditio-bis-2 nitrobenzoato (I) para produzir o ânion amarelo do ácido 5-tio-2 nitrobenzóico (II).

A atividade enzimática será medida através da leitura da variação da absorbância por minuto, durante 3 minutos, sendo a reação linear durante, pelo menos, 10 minutos (ALLES; HAWES, 1953). As leituras das absorbâncias foram feitas no comprimento de onda de 412 nm, através de um espectrofotômetro (*Beckman* DU acoplado a um sistema de modernização da Gilford, USA ou *Beckman*, modelo DU 640B, CA, USA) que permitiu leituras automáticas em sistema digital e forneceu maior sensibilidade (leitura em décimos de milésimos de absorbância). A atividade específica foi expressa em nmoles de ATC hidrolisados por miligrama de proteína por minuto.



As soluções utilizadas neste teste:

- Solução de ácido 5:5’-dito- bis-2 nitrobenzoato, DTNB (Sigma, St. Louis, MO, USA) 10 mM em tampão de sódio;

- Solução de iodeto de acetilicolina, ATC (Sigma, Sr. Louis, MO, USA) 75 mM em água bidestilada; Tampão de Fosfato de Sódio: NaH2OPO4.H2O, 0,1 mM em água bidestilada, pH 7.0.

Os tecidos serão homogeneizados em tampão fosfato 10% e o homogenato (5 µL) será adicionado a uma cubeta contendo 500 µL do tampão, 895 µl de água destilada e 50 µL de ácido ditiobisnitrobenzóico (DTNB) 0,01M e a absorbância zerada.

Após a absorbância ser deixada em zero, a cubeta é retirada e acrescentado 50µL de iodeto de acetiotiocolina (ATC) (QUADRO 3). Absorbância será registrada por 3 min, em 412 nM. A atividade da enzima será calculada como modificações na absorbância do minuto 3 para o minuto 0, relativo ao conteúdo de proteína contido no homogenato (LOWRY *et al*., 1951).

**3.5.7 Dosagem de Proteína**

O método é baseado na interação do corante *Coomassie Blue* G250 (BG250) e macromoléculas de proteínas que contêm aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica que absorve fortemente em 595nm.

A Solução Mãe de *Coomassie Blue* G250 será diluída 5x com H2O destilada antes de ser usada e permanecerá na geladeira por, no máximo, uma semana (Ex.: 1mL da solução mãe + 4mL de água destilada) - SOLUÇÃO DE *BRADFORD* Adicionar-se-ão as soluções (albumina padrão, água destilada, tampão e amostras) aos poços.

Em cada poço será adicionado 40µL de solução. Por exemplo, se no poço forem adicionados 2µL da amostra, também serão adicionados 38µL do tampão utilizado no preparo da amostra.

Albumina em concentrações crescentes (EM DUPLICATA para fazer a curva padrão) Amostras (tampão utilizado para o homogenato e em seguida será acrescentado às amostras: o volume final deve ser de 40µL). Branco – 2 poços somente com o homogenato utilizado. Após preencher a placa, serão adicionados 200 µl da solução de bradford (diluída) em cada poço. A leitura será realizada 5 minutos, em comprimento de onda de 595nm(BRADFOR, 1976).

**3.5.8 Determinação dos níveis de BDNF**

Após homogeneização das áreas cerebrais a 20 volumes de tampão PBS pH 7,4 adicionado de inibidores de protease (Sigma-Aldrich), o nível de BDNF de cada amostra será quantificado por ensaio imunoenzimático (ELISA; R&D Systems, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados serão expressos como picograma de BDNF/ mg de proteína total determinada pelo método de Lowry (1951).

**3.5.9 Determinação dos níveis de fosfo-Ser9-GSK3**

Após homogeneização das áreas cerebrais a 20 volumes de tampão PBS pH 7,4 adicionado de inibidores de protease (Sigma-Aldrich), os níveis de fosfo-GSK-3β de cada amostra serão quantificados por ensaio imunoenzimático (Human/Mouse/Rat Phospho-GSK-3β (S9) ELISA; R&D Systems, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados serão expressos como picograma de GSK-3 beta/ mg de proteína total determinada pelo método de Lowry (1951).

**3.5.10 Avaliação de alterações inflamatórias**

Os níveis da citocinas pró-inflamatórias, IL-1β, TNFα e citocina antiiflamtória IL10 e TGFβ serão determinados por técnica de ensaio imunossorvente ligado a enzima (Elisa) coulorimétricos de acordo com as instruções do fabricante R&D systems.

A detecção do fator nuclear NFkB será realizada também por técnica de Elisa através de kit coulorimétrico adquirido da Merck Millipore (NFκB p50/p65 EZ-TFA Transcription Factor Assay (Colorimetric)). Vale salientar que este fator é importante na regulação de processos celulares e fisiológicos, tais como: crescimento celular, apoptose, resposta imune e inflamatória, dentre outros.

### 3.6 Imunofluorescência

A imunofluorescência será realizada com a finalidade de obter dados quantitativos da marcação dupla de GFAP e Fosfocreb, NFκB e NeuN no hipocampo.

Após a remoção da área cerebral, a mesma será isolada, separada e fixada em formol tamponado a 10% por 24 horas, seguidas de trocas de sacarose a 30% por 72 horas. Os tecidos serão crioarmazenados em *tissue tek* e guardados no -80 C até o corte no micrótomo, obtendo-se espessuras de 4µm que serão recolhidos e aderidos em lâminas de vidro histológicas silanizadas. Será realizada a recuperação antigênica, com a finalidade de expor os epítopos, onde as lâminas serão mergulhadas em tampão citrato (pH= 6,0) por 20 min no banho Maria à 99ºC. Em seguida, as lâminas serão lavadas duas vezes, três minutos cada, com PBS 1%. Na etapa seguinte, as lâminas serão lavadas três vezes com PBS por 5 minutos cada lavagem, e em seguida seá realizada a permeabilização por 10 min com PBS/0,2% triton-X-100. Na etapa seguinte, realizar-se-á o bloqueio dos cortes para reduzir as marcações inespecíficas com solução de bloqueio (780μL de PBS/1% triton-X-100, 20μL de soro de cavalo e 200 μL BSA 5%). Após o bloqueio, os cortes cerebrais serão incubados com os anticorpos primários anti-GFAP (Santa Cruz *Biotechnology*, SC-6170, 1:100), , anti-iNOS (Santa Cruz *Biotechnology*, SC-8310, 1:100), anti-Iba-1 (Abcam, ab107159, 1:50), ou anti-NFκB NLS (Santa Cruz *Biotechnology*, SC-114, 1:200), diluídos em BSA 1%, *overnight* a 4°C em câmara úmida para evitar o ressecamento dos cortes. Para confecção dos controles negativos, os anticorpos primários serão omitidos. Na etapa seguinte, será efetuado a lavagem dos cortes com PBS por cinco minutos e será incubado com os anticorpos secundários Alexa fluor 488 donkey anti-rabbit (Invitrogen, A21206, 1:500), Alexa fluor 594 donkey anti-mouse (Invitrogen, A21203, 1:400) e Alexa fluor 594 donkey anti-goat (Invitrogen). Após a remoção do anticorpo secundário e lavagem com PBS por 4 vezes de 5 minutos cada, aplicar-se-á, por 7 min, DAPI (4, 6-diamidino-2-fenilindol, Invitrogen) para a marcação nuclear. Por fim, as lâminas serão lavadas com PBS por 4 vezes durante 5 min cada, secadas e aplicado o Fluoromaut (DAKO) para inserir a lamínula.

As imagens serão adquiridas e quantificadas por meio de um microscópio Cytation ( USA) usando uma objetiva de 40x/NA 1,4 .

### 3.7 Expressão Gênica de iNOS e AchE por qPCR.

### 3.7.1 Preparação das amostras

Os fragmentos de hipocampo dos animais serão retirados e macerados em nitrogênio líquido. Posteriormente, os fragmentos macerados serão adicionados em microtubo com 100μL de tampão de lise (Promega, EUA). Em seguida, serão armazenados no freezer a -80ºC até sua utilização para extração do RNA.

### 3.7.2 Extração do RNA

O RNA total de cada amostra será isolado usando kit de extração de RNA (Promega). Resumidamente, as amostras com tampão de lise serão misturadas cinco vezes por inversão. Será adicionado às amostras 350 μL de tampão de diluição do RNA, sendo homogeneizadas quatro vezes por inversão. Em seguida, as amostras serão aquecidas por três minutos a 70°C, com o objetivo de romper as ligações dos ácidos nucléicos, e centrifugadas por 10 min. O sobrenadante será transferido para um microtubo. Adicionar-se-á 200 μL de etanol a 95%. Na fase seguinte, a mistura será transferida para *spin basket* acoplado a um microtubo coletor de 2 mL e centrifugado a 11200 RPM por um minuto. Adicionar-se-á 600 μL de solução de lavagem e em seguida os tubos serão centrifugados por 11200 RPM por um minuto. Na etapa seguinte, as amostras serão tratadas com DNase para reduzir a contaminação com o DNA, sendo incubadas em temperatura ambiente por 15 min. Decorrido este tempo, 200 μL de DNase *stop solution* serão adicionados e as amostras serão centrifugadas por 1 min a 11200 RPM. Logo em seguida, será inserido tampão de lavagem e as amostras serão centrifugadas, conforme relatado anteriormente. Será adicionado 250 μL de tampão de lavagem seguida de centrifugação por 2 min em 11200 RPM. Na etapa seguinte, o *spin* será inserido em novo microtubo de 1,5 mL, 40 μL de H2O livre de nuclease serão adicionados e os microtubos serão centrifugados por 1 minuto. Por fim, o *spin basket* será descartado e o RNA será extraído e armazenado no freezer -70°C.

Após a extração do RNA de cada amostra, será efetuado a sua quantificação, com 1μL de RNA de cada amostra, utilizando Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, EUA). Concomitante a dosagem em ng/μL, realizar-se-á a avaliação da qualidade do RNA extraído, a qual será obtida por meio da relação 260/280, fornecida pelo programa relacionado ao aparelho. A avaliação da quantidade de RNA presente em cada amostra é de extrema importância para a obtenção da quantidade de amostra adequada para realização da próxima etapa, a saber: síntese do ácido desoxirribonucléico complementar (cDNA).

### 3.7.3 Síntese do cDNA

O cDNA será sintetizado de acordo com o High capacity cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, USA). O volume final de cada amostra será de 20μL: 2 µL do reagente 10x tampão da enzima; 0,8 µL de oligonucleotídeos; 2 µL de primer; 1 µL da enzima transcriptase reversa; 1ng de RNA, onde o volume utilizado em µL será dependente da concentração inicial extraída; H2O de nucleases para completar 20 µL. O protocolo da reação será realizado a 25º C por 10 min, 37º C por 120 min, 85º C por 5 min. O cDNA será armazenado em freezer a -20º C até a sua utilização no qPCR.

### 3.7.4 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

A expressão gênica de iNOS e de AchE será avaliada por meio do sistema de PCR em tempo real (Light cycler 96, Roche), utilizando kit de TaqMan PCR master mix (Life Technologies). O gene de referência utilizado será o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Todas as sondas utilizadas e as condições do qPCR estão apresentadas no quadro 1.

Os valores de *Threshold cycle* (Cq ou Ct), obtidos pelo software do equipamento, dos genes avaliados serão exportados para o Microsoft Office Excel 2010, no qual os níveis relativos de RNAm serão calculados de acordo com a metodologia descrita por Livak e Schmittgen (2001).

|  |  |
| --- | --- |
| iNOS (Óxido nítrico sintase induzida) | |
| ID assay | Mm00440502\_m1 |
| TaQman probe | GCCTTGTGTCAGCCCTCAGAGTACA |
| Amplicon length: | 66 |
| GAPDH (Gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase) | |
| ID assay | Mm99999915\_g1 |
| TaQman probe | GGTGTGAACGGATTTGGCCGTATTG |
| Amplicon length: | 109 |
| AchE (acetilcolinesterase) |  |
|  |  |
| ID assay | Mm00440502\_m1 |
| TaQman probe | CCTGTGCGGGCAAAATTGCTGGATCCCT CGCTGAA |
| Amplicon length: | 66 |

Fonte: Elaborado pela autora.

### 3.8 Western Blotting

Inicialmente, será preparado 20 µg de proteína referente a cada amostra, adicionando tampão da amostra (BioRad, EUA 65,8 mM Tris-HCl, pH 6,8; 26,3% glicerol; 2,1% SDS; 0,01% azul de bromofenol) e β-mecaptoetanol (BioRad, EUA), vortexando por 10 s, aquecendo no banho maria (95ºC, 5 min) e centrifugando (10000 rpm, 4ºC, 30s). Em seguida, será realizado a eletroforese vertical de proteínas em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) a 60 v nos primeiros 15 min para deposição das amostras no fundo do poço e 120 v para o restante da corrida, onde será utilizado gel a 10% (caspase 3 e β-catenina) ou e tampão de corrida (25 mM Tris; 192 mM glicina; 1% SDS). Após a corrida, será efetuado a transferência por eletroforese das proteínas do gel para a membrana de PVDF (BioRad, EUA, Fluoreto de polivinilideno) a 100 v por duas horas em tampão de transferência (25 mM Tris; 192 mM glicina; 20% metanol). Após esta etapa, as membranas serão bloqueadas por uma hora em agitação constante, para reduzir as ligações inespecíficas, com 5% BSA (Sigma-Aldrich, EUA) diluído em tampão salina Tris-HCl suplementado com Tween 20 (TBST- 20 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1% Tween 20). Em seguida, será realizado a lavagem das membranas com TBST, sendo três lavagens por 10 min cada. Na etapa seguinte, as membranas serão incubadas, overnight a 4ºC sob agitação constante, com os anticorpos anti-caspase 3 e β-catenina) diluídos em 1% de BSA em TBST. Após esta etapa, será realizado três lavagens de 10 min cada com TBST. As membranas serão incubadas com os anticorpos secundários HRP-goat anti-rabbit (Invitrogen, 656120, 1:1000) ou HRP-rabbit anti-goat (Invitrogen, A16142, 1:1000) por duas horas em temperatura ambiente. Decorrido este tempo, as membranas serão lavadas três vezes, duração de 10 min cada, com TBST. Enfim, adicionar-se-á o reagente de quimioluminescência (BioRad, EUA, *Clarity western ECL blotting substrate*) e as membranas serão agitadas por 5 min. As imagens das bandas serão capturadas por um sistema de ChemiDoc XRS (BioRad, EUA) .A densidade das bandas será mensurada por meio do software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EUA).

**3.9 Análise estatística**

Será utilizada ANOVA e teste de Student Newman Keuls para os testes paramétricos. O programa de computador será o GraphPad Prism 5.0. O critério de significância será p< 0,05.