

DADOS DO PLANO DE TRABALHO 2	
Título do Projeto de Trabalho	Avaliação da Atividade Locomotora, Antidepressiva e Neuroquímica dos Florais de Bach em Ratos Submetidos à Isquemia Cerebral
Modalidade de Bolsa solicitada	PIBIC
Título do Projeto de Pesquisa	Avaliação dos Efeitos Antidepressivo e Ansiolíticos dos Florais de Bach em Animais de Laboratório

1. OBJETIVOS

Avaliar os efeitos centrais dos Florais de Bach sobre as atividades locomotora, antidepressiva e neuroquímica dos ratos em condições experimentais, no período de agosto de 2019 a julho de 2020.

2. METODOLOGIA

Serão utilizados 70 ratos Wistar, machos adultos, com peso médio de 180-200g previamente selecionados de matrizes do BIOEXA. Durante a fase experimental, os animais receberão água e ração à vontade. Os ratos ficarão alojados em uma sala climatizada com exaustores, com uma temperatura média de 23°C. A luminosidade fornecida na referida sala constará de um ciclo de 12h claro e 12h escuro.

A pesquisa será conduzida utilizando um experimento do tipo cego. Os florais testados serão Agrymony, Gorse e Clematis, utilizando-se 2 gotas das essências em 30 ml de água destilada. Os animais serão tratados durante 7 dias por administração oral de 0,45 ml da solução dos florais testados. Na fase experimental, os animais também receberão imipramina (SIGMA, EUA) e diazepam (CRISTÁLIA, Brasil).

Os ratos machos Wistar serão distribuídos em grupos conforme quadro abaixo:

Tratamentos utilizados na fase experimental

Grupo (n=10)	Condição fisiológica do animal	Tratamento
1 - FO	falso operado	receberá água destilada 0,45 ml/dia (vo)
2 - I	isquemiado	receberá água destilada 0,45 ml/dia (vo)
3 - I /FBA	isquemiado	tratado com florais de Bach Agrymony, receberá 0,45 ml/dia (vo)
4 - I /FBG	isquemiado	tratado com florais de Bach Gorse, receberá 0,45 ml/dia (vo)
5 - I /FBC	isquemiado	tratado com florais de Bach Clematis, receberá 0,45 ml/dia (vo)
6 - I /IMIP	isquemiado	tratado com imipramina, receberá 10 mg/kg/dia (ip)
7 - I /IDZ	isquemiado	tratado com diazepam, receberá 0,75 mg/kg/dia (ip)

Os animais serão submetidos ao modelo de isquemia cerebral transitória por oclusão bilateral das carótidas durante 30 minutos, seguida de reperusão. Os ratos serão anestesiados com cloridrato de ketamina (Dopalen - Laboratório Ceva, apresentação 1g/10mL) na dose 100 mg/kg (ip) e sedados com Xilazina (Anasedan - Laboratório Ceva, apresentação 2g/100mL) na dose 10 mg/kg (ip).

Após tricotomia será feita uma incisão medial na altura da traqueia para exposição das carótidas em ambos os lados, as quais serão isoladas e clampeadas simultaneamente com pinças buldogues. Após 30 minutos, os buldogues serão removidos e o local da incisão suturado. Os animais serão alojados em gaiolas individuais para recuperação da cirurgia com ração e água *ad libitum*. O grupo falso-operado será submetido ao procedimento idêntico, exceto pelo clampeamento das carótidas.

Após a cirurgia, os animais serão tratados por gavagem durante sete dias. No sétimo dia de tratamento, após 1 hora da última administração, os ratos serão avaliados quanto à atividade exploratória (campo aberto) e atividade antidepressiva (nado forçado). Após os testes comportamentais os animais serão eutanasiados por decapitação em guilhotina (Harvard, USA) e o corpo estriado serão dissecados sob gelo para preparação de homogenatos e determinação de monoaminas e metabólitos em HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*).

(1) AVALIAÇÃO DOS EFEITOS SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA

Os animais serão colocados individualmente numa arena construída em madeira (50 x 50 x 20 cm) com piso dividido em 4 quadrados iguais. A atividade locomotora será avaliada pelo número de cruzamentos e comportamentos estereotipados (*rearing* e *grooming*) durante 5 minutos. Após o tratamento com os florais de Bach, como descrito por Rodrigues et al. (1996), os ratos experimentais serão submetidos a uma sessão de teste em campo aberto ("*Open-Field*"), com o intuito de excluir a possibilidade de que os florais pudessem atuar sobre o sistema locomotor dos animais, afetando os resultados dos testes comportamentais.

Serão considerados todos os grupos para este teste: FO, I, I-FBA, I-FBG, I-FBC, I-IMIP e I-DZP.

(2) AVALIAÇÃO DOS EFEITOS SOBRE A ATIVIDADE ANTIDEPRESSIVA

Para detectar o efeito antidepressivo será utilizado o teste do nado forçado ou teste do desespero comportamental ("*behavioural despair*"). Este teste foi desenvolvido por Porsolt, Bertin e Jalfre (1977) para a pesquisa com drogas antidepressivas. Os ratos serão colocados individualmente em cilindro de vidro (altura = 60 cm; diâmetro = 20 cm) contendo 30 cm de água e monitorados por 5 minutos. Será registrado o tempo total de imobilidade (em segundos) para cada animal e a latência para apresentação de tal comportamento. Considera-se como "imobilidade" quando o animal faz apenas os movimentos mínimos para manter a cabeça fora da água.

Serão considerados para este teste os grupos: FO, I, I-FBG e I-IMIP.

(3) DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE MONOAMINAS/AMINOÁCIDOS

Será utilizado o equipamento de HPLC com detector de fluorescência. Os animais serão decapitados e, imediatamente, seus cérebros dissecados sobre gelo. O corpo estriado será utilizado para preparar homogenatos a 10%. Os tecidos cerebrais serão sonicados em ácido perclórico (HClO₄). O sobrenadante será separado e associado a uma solução de derivatização pré-coluna, para obtenção de fluorescência, em uma proporção de 1:1. Um minuto depois do início dessa associação uma alíquota de 20 µl será retirada e injetada no equipamento de HPLC.

Os dados coletados serão tabulados em planilha do Excell e processados por meio de análise da variância seguida pelo teste de múltipla comparação, utilizando-se o método de Dunnett e/ou Newman-Keuls, quando apropriado. Valores de $p < 0,05$ serão considerados como indicativos de significância.

3. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

ATIVIDADES	2019 - 2020											
	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL
Revisão de Literatura	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Treinamento do bolsista		X										
Avaliação dos efeitos sobre a atividade locomotora			X	X	X							
Avaliação dos efeitos sobre a atividade antidepressiva						X	X	X				
Determinação dos níveis de monoaminas/aminoácidos							X	X	X			
Tabulação dos dados coletados			X	X	X	X	X	X	X			
Análise estatística dos dados coletados				X	X	X	X	X	X	X		
Relatório parcial dos resultados da pesquisa						X	X					
Confecção de tabelas e gráficos do resultado da pesquisa						X	X	X	X	X	X	
Redação dos resultados da pesquisa								X	X	X	X	
Relatório final dos resultados da pesquisa											X	X
Redação de trabalhos para eventos científicos												X
Redação de artigos científicos para revista												X