

Dados do Plano de Trabalho 1	
Título do Plano de Trabalho:	Comparação do comportamento motor e atividade antidepressiva com os níveis estriatais de monoaminas de filhotes submetidos à isquemia/reperfusão cerebral de ratas tratadas com ômega-3 desde a gestação até a lactação
Modalidade de bolsa solicitada:	PIBIC
Projeto de Pesquisa vinculado:	Avaliações neuroquímicas e comportamentais de filhotes submetidos à isquemia/reperfusão cerebral de ratas tratadas com ômega-3 durante a gestação e lactação

1 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar as alterações neuroquímicas e comportamentais de filhotes submetidos à isquemia/reperfusão cerebral de ratas tratadas com ômega-3 (ácido docosaheptaenóico e ácido eicosapentaenóico) durante a gestação e lactação.

Objetivos Específicos

- Avaliar alterações comportamentais dos filhotes submetidos ou não a isquemia cerebral através dos testes do campo aberto (atividade locomotora) e nado forçado (depressão);
- Determinar os níveis estriatais de monoaminas: dopamina (DA), 5-hidroxitriptamina (5-HT) e seus metabólitos: ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA) e ácido 5-hidroxiindol-3-acético (5-HIAA);

2 METODOLOGIA

O protocolo experimental será encaminhado a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina do Cariri / Universidade Federal do Ceará. Todos os esforços serão feitos para minimizar o sofrimento dos animais segundo critérios da Internacional Ethical Guidelines. (CIOMS/OMS, 1985). Para a realização do estudo, serão utilizados ratos Wistar (adultos e filhotes, machos e fêmeas) provenientes do Biotério de Experimentação Animal da Faculdade de Medicina do Cariri – BIOEXA/FAMED. Os animais serão aclimatados no Laboratório de Pesquisa em Neurociências e Neuroproteção - LAPENN, mantidos em temperatura ambiente controlada (21 a 23°C), alternância do ciclo claro/escuro de 12 horas, tendo livre acesso à água e ração. As fêmeas (180 a 200 g) serão acasaladas na proporção de 3 fêmeas para 1 macho (200 a 220 g), as quais serão separadas dos machos após o quinto dia de acasalamento, ficando cada uma em caixas separadas. As fêmeas serão submetidas ao tratamento diário com ômega-3 por gavagem nas doses de 5 e 10 mg/kg/dia e os grupos controles com veículo (água destilada+tween80, 0,1mL/100g, vo) durante todo o período gestação e lactação. Seus filhotes (machos e fêmeas) serão submetidos à isquemia cerebral global transitória por oclusão da artéria carótida comum esquerda por 15 minutos seguida de reperfusão no curso do 14º dia pós-natal.

Nesse estudo será utilizada a droga ProepaGesta (Aché Laboratórios

Farmacêuticos SA, Brasil) como a fonte dos ácidos graxos ômega-3 (DHA e EPA). Cinco cápsulas de ProepaGesta serão utilizadas na preparação de uma solução mãe na concentração de 21,19mg/mL (5.000 mg/236 mL). O tween 80 (concentração menor que 0,5% da solução preparada) será utilizado como emulsionante para solubilizar o ômega-3 em água destilada. Os animais serão tratados por via oral (v.o.) com ômega-3 nas doses de 5 e 10 mg/kg/dia. Os animais controles receberão o veículo, contituído de água destilada acrescido de twenn 80 (0,1mL/100g) por via oral.

Cloridrato de ketamina (Dopalen - Laboratório Ceva, apresentação 1g/10mL) será utilizado como anestésico geral e administrado na dose 25 mg/kg (intraperitoneal).

Os animais serão divididos em seis grupos:

FO: Ratas (n=2) não tratadas para filhotes (n=8) falso-operados.

ISQ: Ratas (n=2) não tratadas para filhotes (n=8) isquemiados.

FO+Ômega-3/5mg: Ratas (n=2) tratadas com Ômega-3/5mg/kg para filhotes (n=8) FO

FO+ Ômega-3/10mg: Ratas (n=2) tratadas com Ômega-3/5mg/kg para filhotes (n=8) FO

ISQ+Ômega-3/5mg: Ratas (n=2) tratadas com Ômega-3/5mg/kg para filhotes (n=8) isquemiados

ISQ+Ômega-3/10mg: Ratas (n=2) tratadas com Ômega-3/10mg/kg para filhotes (n=8) isquemiados

As mães serão submetidas ao tratamento diário de ômega-3 por gavagem nas doses de 5 e 10 mg/kg/dia e os grupos controles com veículo (água destilada+tween80, 0,1mL/100g, vo), no período gestação que compreende 21 dias e durante a lactação, por mais 21 dias. No 14º dia pós-natal seus filhotes serão submetidos à cirurgia para isquemia cerebral e serão mantidos com suas mães mais 7 dias, período da investigação dos testes comportamentais e neuroquímicos.

Assim, os filhotes machos e fêmeas (16-18g) no 14º dia de vida serão submetidos à isquemia cerebral global transitória por oclusão unilateral da artéria carótida comum esquerda, por um período de 15 minutos, seguida de reperfusão. Os animais serão previamente anestesiados com cloridrato de ketamina na dose de 25mg/kg (0,01ml/100g, i.p.), em seguida será realizado antissepsia e tricotomia no local da incisão. A carótida comum esquerda será identificada e clampeada com pinça bulldog por 15 minutos. Após esse tempo, o clamp será retirado para reperfusão e realização da sutura. O grupo falso-operado será submetido ao mesmo procedimento, exceto a oclusão da carótida comum esquerda. Durante e após o procedimento cirúrgico os animais serão aquecidos com foco infravermelho. Depois da recuperação anestésica (2 horas) os animais serão devolvidos as gaiolas das mães para aleitamento. No sétimo dia de tratamento, após 1 hora da última administração de ômega-3 às ratas mães, os filhotes serão avaliados quanto à atividade exploratória (campo aberto) e nado forçado (modelo de depressão). Após os testes comportamentais os animais serão eutanasiados por decapitação em guilhotina (Harvard, USA) e o corpo estriado e hipocampo serão dissecados sob gelo para preparação de homogenatos e determinação de monoaminas e metabólitos em HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

Teste do Campo Aberto: O teste de campo aberto é utilizado para avaliar a atividade locomotora, défices motores e ansiedade. A atividade locomotora é medida através da determinação da distância percorrida (número de cruzamentos) e comportamentos estereotipados (rearing e grooming). O teste é sensível à disfunção motora, bem como a danos dos 7 gânglios da base e do hipocampo. Durante o teste se avalia a capacidade exploratória do animal, durante 5 min, em uma arena. A arena é construída em madeira com dimensões igual a 30 x 30 cm e possui 15 cm de altura, com piso dividido em 9 quadrados iguais. Os animais serão avaliados no sétimo dia de tratamento pós-isquemia cerebral. Após uma hora do último tratamento, os ratos serão coloca-

dos na arena com as quatro patas no centro do campo aberto e o seu comportamento será observado por 5 minutos. Os parâmetros comportamentais observados neste teste serão: número de cruzamentos (NC), número de rearing (NR) e número de grooming (NG)

Teste do Nado Forçado: Esse teste é comumente usado na avaliação da efetividade de agentes antidepressivos, pelo aumento da atividade natatória do animal. O teste será realizado colocando o animal no tanque cilíndrico de acrílico, com 10 cm de diâmetro (base) e 30 cm de altura preenchido com água até uma altura de 15 cm, e contado o tempo de imobilidade por cinco minutos.

Determinação dos Níveis de Monoaminas e Metabólitos: Os animais serão decapitados com uma guilhotina (Harvard, USA) e, em seguida, os encéfalos serão retirados e colocados sobre papel alumínio sobre gelo. Acompanhando a fissura sagital mediana, a camada cortical cerebral será liberada das leptomeninges com a ajuda de uma pinça reta de microdissecação para divulsionar o córtex delicadamente, em toda a sua extensão fronto-occipital. O córtex já divulsionado será rebatido para os lados, expondo o corpo estriado (caudado, putamen e globo pálido) que será deslocado e retirado. O estriado dos animais será então utilizado para preparar os homogenatos a 10% em ácido perclórico (HClO₄). O estriado será sonificado em 0,1 M HClO₄, durante 30 s, centrifugados a 4°C durante 15 min a 15.000 rpm, e os sobrenadantes serão filtrados (0,2 µm, Millipore). Vinte microlitros de amostra serão então injetados na coluna (Shim-Pack CLC-ODS, 25cm) do HPLC (Shimadzu, modelo LCD-6A com detecção eletroquímica) em fluxo de 0,6 mL/min. A fase móvel será preparada com 0,163 M de ácido cítrico, pH 3,0, contendo 0,02 mM de EDTA com 0,69 mM de ácido octanossulfônico sódico (SOS), acetonitrila a 4% v/v e tetra-hidrofurano 1,7% v/v. As monoaminas serão eletroquimicamente detectadas, utilizando um detector amperométrico (Shimadzu, Japão), por oxidação de um eletrodo de carbono vítreo a 0,85 V em relação ao eletrodo de referência de Ag-AgCl. As suas concentrações serão determinadas por comparação com as médias dos padrões injetados na coluna do HPLC no dia da experiência, e os valores expressos como ng/mg de tecido.

3 CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

	2019							2020				
Atividades	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5
Revisão/atualização de literatura	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Procriação e tratamento dos animais	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
Cuidados gerais com os animais	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Cirurgia de isquemia/reperfusão na prole		X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Testes comportamentais		X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Determinação dos níveis de monoaminas			X	X	X	X	X	X	X	X		
Análise estatística e elaboração de resumo para apresentação em congresso											X	
Produção de artigo científico											X	X
Relatório final												X