

<b>Dados do Plano de Trabalho 2</b>	
<b>Título do Plano de Trabalho:</b>	Avaliação morfológica e de estresse oxidativo em cérebros de filhotes submetidos à isquemia/reperfusão cerebral de ratas tratadas com ômega-3 da gestação à lactação
<b>Modalidade de bolsa solicitada:</b>	PIBIC
<b>Projeto de Pesquisa vinculado:</b>	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 docosahexaenóico e ácido eicosapentaenóico) durante a gestação e lactação.

### Objetivos Específicos

- Determinar o estresse oxidativo a partir das concentrações de Nitrito e TBARS no corpo estriado e hipocampo de filhotes submetidos ou não a isquemia cerebral, tratados ou não com ômega-3;
- Avaliar morfológicamente as áreas de infarto cerebral coradas com 2,3,5-cloreto trifeniltetrazólio (TTC).

## 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.

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+twenn80, 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 (Dopalen - Laboratório Ceva) 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 bulldogue 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 animais serão eutanasiados por decapitação em guilhotina e o corpo estriado e hipocampo serão dissecados sob gelo para preparação de homogenatos para dosagem de nitrito e TBARS. Um animal de cada grupo será aleatoriamente escolhido e seu cérebro retirado para coloração por 2,3,5-cloreto trifêniltetrazólio (TTC).

**Determinação das concentrações de nitrito:** O reativo de Griess revela a presença de nitrito nas amostras analisadas por reação de diazotização que forma um cromóforo de cor róseo, com um pico de absorbância em 560 nm. Serão utilizados 400 µL do reagente de Griess e 400 µL do sobrenadante do homogenato a 10% do tecido (estriado e hipocampo) em solução tamponada de fosfato (PBS) ou salina. Para o branco será utilizado 400 µL do reagente de Griess e 400 µL de PBS. A leitura da absorbância será feita em espectrofotômetro a 560 nm e os resultados expressos em nM. A equação da reta será usada para a determinação da concentração de cada amostra, considerando a leitura da absorbância (y) plotada contra a concentração de nitrito (x).

**Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS):** O grau de lipoperoxidação será medido através da determinação das concentrações de TBARS, conforme o método de Draper e Hadley (1990). Serão utilizados os seguintes reagentes: Ácido tiobarbitúrico 0,6%, Ácido tricloroacético 10%, Tampão de cloreto de potássio (KCl) 1,15% para preparo dos homogenatos. Serão preparados homogenatos das áreas a 10% (p/v) em KCl 1,15%, retirado um volume de 9 50µL do homogenato, colocado em um tubo de ensaio e adicionado 200µL da solução de ácido tiobarbitúrico e 200µL da solução de ácido tricloroacético 10%. Em seguida, após agitação da mistura,

essa será colocada em banho-maria (95-100°C). Após 15 minutos, os tubos serão resfriados em banho de gelo até voltar à temperatura ambiente. Os próximos passos serão centrifugar a 4000 rpm durante 5 minutos, retirar alíquotas de 100µL, colocar nos poços em placa de Elisa e medir a absorbância no Elisa com um comprimento de onda de 540nm. Os resultados serão expressos em micromol (µmol) de malonildialdeído (MDA) por g de tecido.

**Técnica de coloração por 2,3,5-cloreto trifeniltetrazólio (TTC):** Uma solução de Solução de PBS (Phosphate-Buffered Saline, 1X) será previamente preparada. A solução de TTC (2% em peso) deverá ser preparada com PBS a 37°C imediatamente antes da sua utilização. Como o TTC é sensível à luz, as soluções devem ser mascaradas com papel alumínio. Após anestesia com cloridrato de ketamina na dose 25 mg/kg (ip), será realizada a eutanásia por decapitação e os encéfalos dos animais rapidamente removidos e refrigerados a -86 °C por 4 min para endurecer levemente o tecido com objetivo de facilitar o corte em fatias. Com o auxílio de uma matriz para corte de cérebro de rato, os encéfalos serão seccionados no plano coronal em 3 a 4 fatias de 2mm de espessura, do bulbo olfatório para o cerebelo. As fatias serão colocadas numa placa de Petri de vidro contendo uma camada superficial de 2% de corante TTC, e lamelas de vidro molhadas com a solução TTC serão colocadas em cima de cada fatia para garantir uma coloração uniforme, deixando as superfícies superior e inferior da seção em contato com o corante. As placas serão cobertas com folha de alumínio para evitar a exposição à luz e incubadas a 37°C durante 30 minutos em ambiente escuro, seguido de fixação por imersão em solução de formaldeído 4% tamponada (pH 7,4) durante 24 horas. As fatias do cérebro serão mantidas planas na placa de Petri durante esse tempo para evitar distorções. As seções coradas serão fotografadas dentro após 1 dia e as imagens analisadas através do software Image J. Nas populações celulares que mantêm o transporte de elétrons mitocondrial o TTC apresenta coloração avermelhada e nas áreas afetadas não ocorre coloração. Os resultados serão apresentados como densidade óptica.

### 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		
Estresse oxidativo: concentrações de nitrito			X	X	X	X	X					
Estresse oxidativo: concentrações de TBARS			X	X	X	X	X					
Coloração por TTC								X	X	X		
Análise estatística e elaboração de resumo para apresentação em congresso											X	
Produção de artigo científico											X	X
Relatório final												X