Plan Overview

A Data Management Plan created using DMP Tool

Title: Caracterização do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal em camundongos glaucomatosos

Creator: Pietra Souza barsanele

Affiliation: Universidade Federal De São Paulo

Principal Investigator: Pietra Souza Barsanele

Data Manager: Pietra Souza Barsanele

Project Administrator: Pietra Souza Barsanele, Maria Nathália Moraes, Maristela de Oliveira Poletini , José Cipolla Neto

Template: Template USP - Mínimo

Project abstract:

O glaucoma é caracterizado por degeneração progressiva das células ganglionares da retina (RGC) e dano ao nervo óptico, sendo o aumento da pressão intraocular (PIO) um dos fatores de risco para o desenvolvimento da doença. As RGCs além de estarem envolvidas com processamento visual projetam-se para o núcleo supraquiasmático hipotalâmico (NSQ), o qual é responsável pela geração e sincronização dos ritmos biológicos ao ciclo de claro-escuro (CE) como, por exemplo, os ritmos de temperatura corporal, atividade locomotora, comportamento alimentar e de secreções hormonais. Demostramos que animais em estágio avançado do glaucoma apresentam alterações no ritmo de atividade locomotora espontânea e de temperatura corporal interna. Ademais, humanos portadores de glaucoma apresentam distúrbios do sono e alterações no ritmo circadiano de temperatura corporal e nas concentrações sanguíneas de cortisol. Considerando que a secreção de glicocorticoides apresenta um perfil circadiano endógeno mediada pelo NSQ, este estudo tem por finalidade avaliar o impacto das alterações rítmicas induzidas pelo glaucoma sobre o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA). Para isso, utilizaremos um modelo animal que desenvolve glaucoma espontaneamente, e avaliaremos os componentes moleculares (expressão gênica e proteica) do eixo HHA em animais glaucomatosos (DBA/2J) e saudáveis (DBA/2J GPNMB+).

Start date: 09-01-2022

End date: 09-30-2024

Last modified: 07-08-2024

Copyright information:

The above plan creator(s) have agreed that others may use as much of the text of this plan as they would like in their own plans, and customize it as necessary. You do not need to credit the creator(s) as the source of the language used, but using any of the plan's text does not imply that the creator(s) endorse, or have any relationship to, your project or proposal

---

Caracterização do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal em camundongos glaucomatosos - Descrição dos Dados e Metadados produzidos pelo projeto

Descrição dos dados e metadados produzidos

Que dados serão coletados ou criados?

Serão utilizados camundongos machos de genótipos DBA/2J (glaucomatosos) e DBA/2J GPNM+ (saudáveis) com 3 e 12 meses de idade. Os procedimentos experimentais deste projeto estarão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal com aprovação do comitê de ética e experimentação animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA nº 8143290819). Os animais serão mantidos em gaiolas ventiladas com fotoperíodo 12C:12E (luz acesa às 7 am e apagada 7 pm) com intensidade de luz de aproximadamente 400 lux, temperatura de 25 (± 1) ^{o} C, com água e alimentação ad libitum. Serão coletados três tipos de dados, sendo eles:

1. **Extração e purificação do RNA, síntese de cDNA e PCR quantitativo:** Será realizado a remoção e a coleta do hipotálamo, da hipófise e da adrenal em animais saudáveis e glaucomatosos, que serão armazenados em -80°C até o processamento das amostras. Será analisado a expressão gênica de *Crh, Per1, Per2* e *Bmal1* na região do PVN no hipotálamo, dos receptores CRH (*Crh-r1*), *Acth, Per1, Per2* e *Bmal1* na hipófise, e nos receptores de ACTH *(Mc2-r), Star, Per1, Per2,* e *Bmal1* na adrenal. Todos esses dados serão organizados em planilhas digitais (Microsoft Excel, formato XLS) ou software GraphPad Prism Version 9.0. Além da geração de gráficos referentes aos procedimentos que serão armazenadas em arquivo TIFF ou JPG.
2. **Dosagem de corticosterona plasmática:** Será realizado a coleta de plasma em animais saudáveis e glaucomatosos, que serão armazenados em -80°C até o processamento das amostras. A dosagem será realizada através do método de imunoensaio enzimático nos ZT4 (fase de repouso) e ZT16 (fase de atividade). A densidade óptica será lida em espectrofotômetro a 450 nm. Todos esses dados serão organizados em planilhas digitais (Microsoft Excel, formato XLS) ou software GraphPad Prism Version 9.0. Além da geração de gráficos referentes aos procedimentos que serão armazenadas em arquivo TIF ou JPG.
3. **Imuno-histoquímica:** Serão coletados os cerébros e as glândulas adrenais os quais serão processados para análise de imuno-histoquímica. As imagens de imuno-histoquímica serão disponibilizadas em formato czi (arquivo editável do programa de análise de imagens Zeiss) e em JPG ou TIFF. A quantificação proteíca será realizada pelo programa Image J e os dados de quantificação serão plotados em planilhas digitais (Microsoft Excel, formato XLS e GraphPad Prism Version 9.0).

Todas as pastas com dados brutos serão estruturados e nomeadas usando as condições utilizadas para efetuar a análise: número do experimento, tipo de análise, data. Por exemplo: Exp01__Corrida_qPCR_Crh-r1_08.12.23. Demais informações podem ser adicionados, caso seja necessário. Os dados brutos ficarão disponíveis aos colaboradores, a Instituição sede e a Agência de Fomento a Pesquisa (FAPESP) através de um sistema de compartilhamento em nuvem a todo e qualquer momento do experimento. Os dados brutos também serão disponibilizados ao público a partir da publicação dos artigos referentes a essa pesquisa através do Repositório de Dados da universidade em que a pesquisadora será matriculada. Informações completas sobre as condições, e métodos usados para produzir os dados também serão fornecidos em um arquivo PDF. Essas informações também estarão disponíveis no sistema de nuvem.

Como os dados serão coletados ou criados

Para coleta de amostras de sangue, hipotálamo, hipófise e adrenal de camundongos de genótipos DBA/2J (glaucomatosos) e DBA/2J GPNMB+ de 3 e 12 meses de idade, mantidos em gaiolas ventiladas com fotoperíodo 12C:12E (luz acesa às 7 am e apagada 7 pm) com intensidade de luz de aproximadamente 400 lux, temperatura de 25 (± 1) ^{0} C, com água e alimentação ad libitum. Os animais serão eutanasiados no período de claro ZT4 (fase de repouso) e no período de escuro ZT16 (fase de atividade). Ao completar essas idades, será realizado a coleta de sangue, do hipotálamo, da glândula hipófise e da adrenal, que serão armazenados em -80°C, até o processamento das amostras.

Para avaliar a expressão gênica de receptores no hipotálamo, hipófise e adrenal no ZT4 e ZT16, os animais saudáveis e glaucomatosos serão eutanasiados com 3 e 12 meses de idade, sendo os tecidos armazenados em -80°C, até o processamento das amostras. Os tecidos passarão pelo procedimento de extração e purificação do RNA (Ambion, EUA). A concentração de RNA será determinada por leitura em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, NanoDrop, DE, EUA). A reação de RT-PCR será realizada com 1 µg de RNA total através do protocolo para enzima Superscript III conforme instruções do fabricante (Thermo Fisher). O cDNA sintetizado será utilizado nas reações de PCR quantitativo. Os pares de primers específicos para cada gene serão baseados nas sequências obtidas no GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank), desenhados pelo programa Primer Blast (pubmed) e sintetizados, preferencialmente, pela IDT. A análise da expressão gênica será realizada através do método de quantificação SYBER Green utilizando-se o equipamento Quantum Studio 6 Flex PCR System (Applied Biosystems, EUA).

Para avaliar a concentração de corticosterona plasmática em animais glaucomatosos e saudáveis no ZT4 e ZT16, o sangue será coletado em microtubo contendo EDTA (Vacuplast, K2 500 µL), em seguida centrifugado a 12.000 x g a 4°C por 15 min para a separação do plasma. O procedimento seguirá as instruções do fabricante (Kit Corticosterone Enzyme Immunoassay Kit DetectX, Arbor Assays). A densidade óptica será lida em espectrofotômetro a 450 nm.

Para a realização da imuno-histoquímica os tecidos provenientes de animais perfundidos com paraformoldeído e congelados serão seccionados em microtómo. As secções passarão por procedimento de imunomarcação com anticorpos específicos para as proteínas de interesse. Ao final, serão montadas lâminas contendo as secções e obtidas fotomicrográfias das áreas de interesse para a quantificação proteíca pelo programa Image J.

A metodologia em detalhes utilizada para cada tipo de coleta, que permitirá alta qualidade para coleta dos dados, está descrita no projeto de pesquisa. Todo material será armazenado e atualizado em sistema de compartilhamento em nuvem, ficando disponível aos colaboradores, Instituição sede e financiadora a qualquer momento no decorrer dos experimentos. As pastas com dados brutos serão estruturadas e nomeadas usando as condições utilizadas para efetuar a análise: título do arquivo, número do projeto, agência financiadora, data. Por exemplo: Corrida_qPCR_Crh-r1_0000/00000-0_FAPESP_08.12.2022. Informações adicionais serão adicionadas quando necessário para permitir facilmente interpretação dos dados. Os dados armazenados incluirão pontos importantes da metodologia utilizada, n amostral, idade do animal, data de eutanásia, período amostral e condições especificas do teste, quando houver. A cópia da dissertação de mestrado será depositada na biblioteca digital de teses e dissertações da universidade que a pesquisadora será matriculada.