

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

MARCO TÚLIO SCHEPIERSKI JÓRIO

**EFEITOS DOS ESTABILIZADORES DE HUMOR SOBRE PARÂMETROS
COMPORTAMENTAIS E NÍVEIS DE FATORES NEUOTRÓFICOS EM UM
MODELO ANIMAL DE MANIA INDUZIDO PELA PRIVAÇÃO DO SONO
PARADOXAL**

**CRICIÚMA
DEZEMBRO, 2019**

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

MARCO TÚLIO SCHEPIERSKI JÓRIO

**EFEITOS DOS ESTABILIZADORES DE HUMOR SOBRE PARÂMETROS
COMPORTAMENTAIS E NÍVEIS DE FATORES NEUOTRÓFICOS EM UM
MODELO ANIMAL DE MANIA INDUZIDO PELA PRIVAÇÃO DO SONO
PARADOXAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Samira S. Valvassori
Coorientador: Prof. Dr. João Quevedo

**CRICIÚMA
DEZEMBRO, 2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

J82e Jório, Marco Túlio Schepierski.

Efeitos dos estabilizadores de humor sobre parâmetros comportamentais e níveis de fatores neurotróficos em um modelo animal de mania induzido pela privação do sono paradoxal / Marco Túlio Schepierski Jório. - 2019.

38 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2019.

Orientação: Samira da Silva Valvassori.

Coorientador: João Luciano de Quevedo.

1. Lítio - Efeitos colaterais. 2. Valproato - Efeitos colaterais. 3. Transtorno bipolar. 4. Privação do sono. 5. Fator neurotrófico derivado do encéfalo. 6. Neurotrofina 3. 7. Neurotrofina 4. 8. Fator neurotrófico derivado da glia. 9. Fator de crescimento neural. I. Título.

FOLHA INFORMATIVA

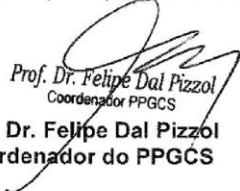
Esta dissertação foi elaborada seguindo o estilo ABNT e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Psiquiatria Translacional, do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, na Universidade do Extremo Sul Catarinense.

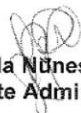


UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA - PROACAD
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 341

Com início às 14h (quatorze horas) do dia onze de fevereiro de 2020 (dois mil e vinte), realizou-se, no Mini Auditório do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **MARCO TÚLIO SCHEPIERSKI JÓRIO** sob a orientação da **Profa. Dra. Samira da Silva Valvassori** intitulada “EFEITOS DOS ESTABILIZADORES DE HUMOR SOBRE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E DE FATORES NEUROTRÓFICOS EM UM MODELO ANIMAL DE MANIA INDUZIDO POR PRIVAÇÃO DO SONO PARADOXAL”. A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. Alexandra Ioppi Zugno (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado, Profa. Dra. Gislaine Zilli Réus (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado e Profa. Dra. Marisa Jadna Silva Frederico (Universidade Federal do Ceará - UFC) – Conceito final: Aprovado. Com o resultado final: **APROVADO**, o aluno finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**. Os trabalhos foram concluídos às 15h (quinze horas), dos quais eu, Fernanda Nunes Peruchi, Assistente Administrativo do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC lavrei a presente ata, que assino juntamente com o Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol, Coordenador do Programa. Criciúma, 11 (onze) de fevereiro de 2020 (dois mil e vinte).


Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol
Coordenador PPGCS
Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol
Coordenador do PPGCS


Fernanda Nunes Peruchi
Assistente Administrativo

RESUMO

O transtorno bipolar (TB) é um transtorno psiquiátrico grave caracterizado pela presença de episódios de mania e depressão. Os principais fármacos utilizados no tratamento do TB são o lítio (Li) e o valproato (VPA). Alguns estudos sugerem o envolvimento de fatores neurotróficos na fisiopatologia do TB. A privação do sono paradoxal (PSP) em camundongos tem sido considerada um bom modelo animal de mania porque induz comportamentos do tipo maníaco, bem como produz alterações neuroquímicas observadas em pacientes bipolares. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do Li e do VPA sobre parâmetros comportamentais e níveis de fatores neurotróficos em um modelo animal de mania induzido pela PSP. Para tal, camundongos C57BL machos foram tratados com Li, VPA ou salina (Sal) por sete dias. O protocolo de PSP teve uma duração de 36h e foi iniciado no quinto dia de tratamento com os estabilizadores do humor. O grupo controle não foi privado do sono e foram mantidos em sua caixa moradia durante todo o experimento. Os grupos experimentais foram os seguintes: 1) Controle+Sal; 2) Controle+Li; 3) Controle+VPA; 4) PSP+Sal; 5) PSP+Li, 6) PSP+VPA. Imediatamente após o protocolo de PSP, a atividade locomotora, a atividade exploratória e o comportamento de risco dos animais foram avaliados no teste do campo aberto. Além disso, foram avaliados os níveis de fatores neurotróficos [fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3), neurotrofina-4 (NT-4), fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), fator de crescimento neural (NGF)] no hipocampo, no córtex frontal e no estriado dos camundongos. A PSP induziu comportamentos tipo maníaco nos animais e o tratamento com Li ou VPA reverteu alterações comportamentais induzidas por PSP. O PSP diminuiu os níveis de BDNF, NGF e GDNF no córtex frontal e no hipocampo de camundongos. A administração de Li ou VPA protegeu o cérebro contra os danos induzidos pelo PSP. No entanto, o PSP e a administração de Li ou VPA não afetaram os níveis de NT-3 e NT-4 nas estruturas cerebrais avaliadas. Em conclusão, o protocolo PSP induziu comportamento do tipo maníaco e diminuição dos níveis de fatores neurotróficos no cérebro de camundongos. Portanto, sugere-se que fatores neurotróficos e sono são alvos essenciais no tratamento do TB.

Palavras-chaves: Privação do Sono; Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo; Neurotrofina-3; Neurotrofina-4; Fator Neurotrófico Derivado da Glia; Fator de Crescimento Neural; Transtorno Bipolar.

ABSTRACT

Bipolar disorder (BD) is a severe psychiatric disorder characterized by the presence of episodes of mania and depression. The main drugs used to treat TB are lithium (Li) and valproate (VPA). Some studies suggest the involvement of neurotrophic factors in the pathophysiology of TB. Paradoxical sleep deprivation (PSD) in mice has been considered a good animal model of mania because it induces manic behavior as well as produces neurochemical changes observed in bipolar patients. The present study aimed to evaluate the effects of treatment with lithium (Li) and valproate (VPA) on behaviors and brain BDNF, NGF, NT-3, NT-4 and GDNF levels in mice submitted to paradoxical sleep deprivation (PSD), which induces an animal model of mania. Male C57BL/6J mice received an intraperitoneal (i.p.) injection of saline solution (NaCl 0.09%, 1 ml/kg), Li (47.3 mg/kg, 1 ml/kg) or VPA (200 mg/kg, 1 ml/kg) once a day for seven days. Animals were randomly distributed into six groups (n = 10 per group): (1) Control + Sal; (2) Control + Li; (3) Control + VPA; (4) PSD + Sal; (5) PSD + Li; or (6) PSD + VPA. Animals were submitted to 36 h of PSD, and then, they were submitted to the open field test. The frontal cortex and hippocampus were dissected from the brain. The manic-like behaviors in the mice were analyzed. Treatment with Li and VPA reversed the behavioral alterations induced by PSD. PSD decreased BDNF, NGF, and GDNF levels in the frontal cortex and hippocampus of mice. The administration of Li and VPA protected the brain against the damage induced by PSD. However, PSD and the administration of Li and VPA did not affect the levels of NT-3 and NT-4 in either brain structure evaluated. In conclusion, the PSD protocol induced manic-like behavior in rats and induced alterations in neurotrophic factor levels. It seems that neurotrophic factors and sleep are essential targets to treat BD.

Keywords: Sleep Deprivation; Brain Derived Neurotrophic Factor; Neurotrophin-3; Neurotrophin-4; Glia Derived Neurotrophic Factor; Neural Growth Factor; Bipolar Disorder.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3 METODOLOGIA	14
3.1 ANIMAIS	14
3.2 TRATAMENTOS.....	14
3.3 PROTOCOLO DE PRIVAÇÃO DO SONO PARADOXAL (PSP).....	14
3.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS	15
3.5 TESTE DE CAMPO ABERTO	15
3.6 AMOSTRAS CEREBRAIS	16
3.7 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS	16
3.8 NÍVEIS DE FATORES NEUROTRÓFICOS	16
3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	17
4 RESULTADOS	18
4.1 ANÁLISES COMPORTAMENTAIS	18
4.2 NÍVEIS DE BDNF	19
4.3 NÍVEIS DE NGF	20
4.4 NÍVEIS DE NT-3	20
4.5 NÍVEIS DE NT-4	21
4.6 NÍVEIS DE GDNF	22
4.7 CORRELAÇÃO ENTRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA E OS NÍVEIS DE FATORES NEUROTRÓFICOS.....	23
5 DISCUSSÃO	28
6 CONCLUSÃO	32
REFERÊNCIAS	33
ANEXOS	38
ANEXO I.....	39

1 INTRODUÇÃO

O Transtorno Bipolar (TB) afeta aproximadamente 1 a 2% da população adulta e está associado a alta morbidade e mortalidade, e caracteriza-se por distúrbios de humor que variam de extrema euforia (mania) a depressão grave, frequentemente acompanhados por características psicóticas e alterações cognitivas (Delgado et al., 2012). O marco clínico do TB são episódios maníacos, que podem ser acompanhados ou não por episódios mistos e depressivos (Sanches et al., 2005). A mania é um estado elevado do humor, no qual o paciente encontra-se expansivo ou irritável por um período de pelo menos uma semana ou se a hospitalização se fizer necessária. O episódio hipomaníaco possui os mesmos critérios de alterações do humor do maníaco, entretanto, com duração mínima de quatro dias. O diagnóstico pelo DSM-V requer que esta alteração do humor, tanto na mania quanto na hipomania, seja acompanhada por pelo menos três sintomas adicionais, citados a seguir: auto-estima inflada ou grandiosidade, diminuição da necessidade de sono, taquilalia, fuga de ideias, distraibilidade, agitação psicomotora e comportamentos de risco (American Psychiatric Association, 2013).

Apesar do marco clínico no diagnóstico do TB ser mania ou hipomania, geralmente, os pacientes passam a maior parte de suas vidas em depressão (Kaltenboeck et al., 2016). O paciente em depressão apresenta o humor deprimido e/ou anedonia, que é acompanhada por perda ou ganho importante de peso, insônia ou hipersonia, retardo ou agitação psicomotora, fadiga ou perda da energia, sentimentos de inutilidade ou culpa excessiva, dificuldade para concentrar-se e pensamentos de morte ou ideação suicida. Cinco ou mais dos critérios citados anteriormente devem estar presentes, por no mínimo, durante duas semanas e comprometer o funcionamento social e/ou ocupacional (American Psychiatric Association, 2013).

Existem dois tipos principais de TB, o TB do tipo I e TB do tipo II. O TB I é caracterizado por episódios recorrentes de mania, com no mínimo um episódio, e episódios depressivos, podendo apresentar 10% a 15% de risco de planejamento ou tentativas de suicídio (Justos e Calil 2004; Moreno et al., 2005). O TB II é definido pela presença de episódios recorrentes de depressão e de hipomania (Delgado et al., 2012). Além do TB do tipo I e do tipo II, ainda existe o transtorno ciclotímico, em que há numerosos episódios de hipomania, intercalados por muitos episódios de depressão, que não preenchem critérios para depressão maior – essa condição deve se manter por pelo menos dois anos, sem intervalos maiores que dois meses livres de sintomas (Justos e Calil, 2004). Estudos epidemiológicos mostraram que o TB pode ser causado por uma mistura complexa de fatores ambientais e genéticos, mas muito

pouco se sabe sobre os mecanismos biológicos específicos subjacentes ao TB. Fatores de risco ambientais, como a perda do suporte social ou a interrupção do ciclo vigília/sono, contribuem para a manifestação dos sintomas (MacCraaken, 1992).

O tratamento do TB é dividido em três fases, sendo elas: aguda, continuação e manutenção. Os objetivos do tratamento da fase aguda são tratar mania sem causar depressão e/ou melhorar depressão sem causar mania. A fase de continuação tem como premissa estabilizar os benefícios, reduzir os efeitos colaterais, tratar até a remissão, reduzir a possibilidade de recaída e aumentar o funcionamento global, e, finalmente, os objetivos do tratamento de manutenção estão inclusos metas como prevenir mania e/ou depressão e maximizar recuperação do paciente de forma que ele permaneça em remissão (Gomes e Souza, 2005).

O Li é o medicamento de primeira escolha para o TB, padrão-ouro usado no tratamento dessa condição médica, sendo o único estabilizador de humor exclusivo aprovado pela Food and Drug Administration (FDA). Esse fármaco apresenta o maior número de estudos controlados demonstrando sua eficácia na mania/hipomania e na prevenção de recorrências; além disso possui uma modesta ação antidepressiva (Moreno et al., 2005). Além do uso do Li também são utilizados antipsicótico atípicos, anticonvulsivantes e antidepressivos. A combinação de um antipsicótico com lítio ou valproato pode ser uma escolha mais efetiva, dependendo de cada caso. Em casos de mania grave, recomenda-se como primeira opção a combinação de lítio e um antipsicótico atípico ou valproato com antipsicótico atípico (Sani et al., 2017). Embora a polifarmácia funcione na maioria dos casos, uma parcela representativa dos pacientes não responde adequadamente ao tratamento, ou apresentam efeitos colaterais graves que levam ao abandono e descontinuação do tratamento por parte dos pacientes (Jawad et al., 2018).

O fator que impede o desenvolvimento de tratamentos completamente eficazes para o TB é o curso clínico complicado, envolvendo episódios de mania e seu oposto – a depressão (Harrison et al., 2018). Embora a fisiopatologia do TB não seja completamente conhecida, os fatores neurotróficos parecem desempenhar um papel importante na neurobiologia e tratamento do TB (Scola e Andreazza, 2015). Os fatores neurotróficos correspondem a um grupo de proteínas responsáveis pela regulação dos processos de sobrevivência, crescimento neuronal, formação sináptica e plasticidade celular no sistema nervoso central e periférico (Gomez e Escobar, 2013). O fator de crescimento do nervo (sigla do inglês - NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (sigla do inglês - BDNF), fator neurotrófico derivado da glia (sigla do

inglês - GDNF), neurotrofina-3 (NT-3) e neurotrofina-4 (NT-4) são os fatores neurotróficos mais estudados nos transtornos psiquiátricos.

O NGF regula a sobrevivência, desenvolvimento e hipertrofia de populações neuronais específicas no sistema nervoso central e periférico (Levi-Montalcini e Angeletti, 1968; Cirulli e Alleva, 2009). Outra neurotrofina bem descrita na literatura é o BDNF, que tem um importante papel na sobrevivência, diferenciação e arborização neuronal do sistema nervoso central e periférico durante o desenvolvimento cerebral e na fase adulta (Kang e Schuman, 1995; Korte et al., 1995; McAllister, 1999; Sohrabji and Lewis, 2006). O GDNF é o fator neurotrófico menos estudado nos transtornos de humor. Este fator neurotrófico é produzido e secretado na região estriatal e desempenha um papel importante na manutenção e sobrevivência de neurônios dopaminérgicos adultos (Granholm et al., 2000; Boger et al., 2006; Pascual et al., 2008). O NT-3 possui um papel importante no desenvolvimento da crista neural do sistema nervoso periférico e sistema nervoso central, possui atividade biológica em diversos tipos de populações neuronais, proporcionando um amplo espectro de ação (Chalazonitis, 2004). A NT-4 é uma neurotrofina estruturalmente muito semelhante ao BDNF, compartilhando com este, 95% da sequência de aminoácidos. Além disso, a NT-4 possui um importante papel na neurogênese durante o desenvolvimento e é diferentemente regulada no desenvolvimento tardio (Bartkowska et al., 2010).

De fato, diversos estudos clínicos e pré-clínicos mostram alterações nos níveis de fatores neurotróficos no TB, como o BDNF (Tunca et al., 2014; Scola e Andreazza, 2014; Fernandes et al., 2011), o GDNF (Tunca et al., 2014; 2015), o NGF (Barbosa et al., 2011a; b), a NT3 e a NT4 (Loch et al., 2015; Barbosa et al., 2014; Fernandes et al., 2011; Huang et al., 2012). Tendo em vista que as neurotrofinas são essenciais para o funcionamento e sobrevivência neuronal, supõe-se que a viabilidade das células nervosas pode ser afetada por uma redução persistente dessas moléculas no SNC (Manji e Chen, 2000). Diversos estudos têm demonstrado uma diminuição dos níveis de BDNF e do seu receptor, TrkB, tanto no sangue quanto no cérebro de pacientes bipolares (de Oliveira et al., 2009; Soontornniyomkij et al., 2011; Thompson Ray et al., 2011; Huang et al., 2012). Além disso, um polimorfismo do gene do BDNF, que substitui uma valina por uma metionina no códon 66 (Val66Met) tem sido associado com a fisiopatologia do TB (Craddock et al., 2005).

Em estudos pré-clínicos anteriores, foi demonstrado que comportamentos do tipo maníaco são acompanhados por diminuição dos níveis de BDNF e GDNF no córtex pré-frontal e hipocampo de ratos (Frey et al., 2006a, 2006b; Jornada et al., 2010; Cechinel-Recco et al., 2012). Do mesmo modo, muitos estudos clínicos têm demonstrado que pacientes bipolares

durante a fase maníaca apresentam níveis de BDNF diminuídos durante os episódios maníacos e depressivos quando comparados com pacientes eutímicos ou controle (Cunha et al., 2006; Fernandes et al., 2011; Gama et al., 2013). Além disso, outro estudo mostrou que indivíduos bipolares, durante a fase maníaca, possuem níveis mais baixos de NGF que pacientes eutímicos ou controles saudáveis, e que essa diminuição de NGF está correlacionada com a severidade dos episódios maníacos (Barbosa et al., 2011a). Seguindo a mesma linha da hipótese do déficit neurotrófico no TB, Barbosa et al. (2011b) promoveram evidências de que os níveis periféricos de GDNF estão relacionados com os diferentes episódios de humor do TB. Quanto as neurotrofinas NT-3 e NT-4, Tseng et al. (2016) demonstrou um aumento de NT-4 em pacientes bipolares. Ainda, em estudos pré-clínicos do nosso grupo de pesquisa foi demonstrado que os níveis de NT-3 e NT-4 estão aumentados no cérebro de animais submetidos à diversos modelos animais de mania (Walz et al., 2008; Valvassori et al., 2019), reforçando o envolvimento dos fatores neurotróficos na fisiopatologia desse transtorno.

Os modelos animais são importantes para a investigação da fisiopatologia, bem como novas estratégias terapêuticas para transtornos psiquiátricos (Beyer e Freund, 2017). Estudos anteriores descrevem que para ser válido, um modelo animal em transtornos psiquiátricos deve demonstrar três características principais: mimetizar os sintomas do determinado transtorno (validade de face); habilidade do modelo em reproduzir alguns aspectos fisiopatológicos e ou etiológicos do transtorno (validade de construção) e, finalmente, os agentes terapêuticos usados no tratamento devem reverter os sintomas induzidos no modelo animal (validade preditiva) (Ellenbroek e Cools, 1990).

O marco clínico para o diagnóstico da TB é a presença de sintomas maníacos; portanto um modelo animal adequado de TB deve assemelhar-se a algumas características de um episódio maníaco, como euforia, irritabilidade, agressividade, hiperatividade, insônia, hipersexualidade, comportamento de risco e / ou aumento de estereotipias (sniffing e grooming) (validade de face) (Logan e McClung, 2016). Algumas evidências têm demonstrado que as alterações do ciclo circadiano podem estar envolvidas com os episódios de mania em pacientes bipolares. Uma avaliação do impacto funcional das alterações dos ritmos circadianos na TB concluiu que a maior parte da deterioração do funcionamento durante o período inter-episódico deveu-se a mudanças nos ciclos circadianos (Robillard et al., 2013). Em concordância com estudos anteriores, também foi demonstrada uma alta prevalência de distúrbios do sono, mesmo em pacientes em fase de remissão (Giglio et al., 2010). Portanto, pode-se considerar que a alterações do ciclo circadiano em animais poderia mimetizar a etiologia e fisiopatologia do TB, contemplando a validade de constructo do modelo.

Baseando-se nessas observações, Armani et al. (2012) desenvolveram o modelo animal de mania induzido por privação do sono paradoxal (PSP), em qual um período de 36 h de PSP induz comportamentos maníacos em camundongos. A PSP em camundongos tem sido considerada um bom modelo animal de mania, pois induz alguns aspectos de um episódio maníaco, como hiperatividade, hipersexualidade e comportamento agressivo (validade de face) (Valvassori et al., 2017a; b). Em relação à validade preditiva, a hiperatividade induzida pela PSP também é revertida pelo Li (Streck et al., 2015). Assim, diferentemente dos modelos farmacológicos de mania, a PSP induz uma variação comportamental além da hiperatividade simples e este modelo é responsivo ao tratamento com drogas fármacos estabilizadores do humor, tornando-o talvez mais efetivo em mimetizar a mania bipolar humana (Valvassori et al., 2017 a; b).

Tendo em vista (1) a gravidade do TB e seu alto impacto na vida de seus pacientes, (2) o fato de que os tratamentos atualmente disponíveis não serem totalmente eficazes e (3) o possível envolvimento dos fatores neurotróficos em sua fisiopatologia; estudar os efeitos dos fármacos clássicos sobre os níveis de fatores neurotróficos se faz importante para melhor compreender a neurobiologia do TB, bem como possíveis formas de melhorar o seu tratamento.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos dos estabilizadores de humor sobre parâmetros comportamentais e sobre os níveis de fatores neurotróficos em um modelo animal de mania induzido pela PSP.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos dos estabilizadores de humor sobre parâmetros comportamentais em camundongos submetidos ao modelo animal de mania induzido PSP.

Avaliar os efeitos dos estabilizadores de humor sobre níveis de BDNF, NGF, GDNF, NT-3 e NT-4 no córtex-frontal, hipocampo e estriado de camundongos submetidos ao modelo animal de mania induzido pela PSP.

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS

Para o presente estudo foram utilizados 60 camundongos *black* C57BL/6 machos adultos obtidos da colônia reprodutiva da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Os animais foram alojados em cinco por gaiola com comida e água disponíveis *ad libitum* e mantidos num ciclo de 12 horas claro / escuro (luzes acendiam às 6:00 da manhã) a uma temperatura de 22 ± 1 ° C. Todos os procedimentos experimentais foram realizados seguindo as Diretrizes do Instituto Nacional de Saúde para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório. Os experimentos foram iniciados apenas após aprovação do comitê de ética local para o uso de animais da Universidade do Extremo Sul Catarinense, sob o protocolo 007/2016-1. Todos os experimentos foram realizados no mesmo horário todos os dias para evitar variações circadianas, e todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais e reduzir o número de animais utilizados.

3.2 TRATAMENTOS

Ao longo de um período de sete dias, os animais receberam uma solução salina intraperitoneal (ip) (Sal, NaCl a 0,09%, 10 mL / kg), Li (47,5mg / kg, 10 mL / kg) ou VPA (200 mg / kg, 10 mL / kg) injeção uma vez por dia. Todas as doses e os tratamentos utilizados no presente estudo foram baseados em resultados anteriores de nosso grupo de pesquisa (Jornada et al., 2010; Valvassori et al., 2015).

3.3 PROTOCOLO DE PRIVAÇÃO DO SONO PARADOXAL (PSP)

Nesse protocolo os animais receberam injeções intraperitoneais diárias de solução salina, Li ou VPA durante 7 dias, duas vezes ao dia. O protocolo do PSP iniciou no 6º dia do tratamento, às 18 horas. Os camundongos foram mantidos em 5 por gaiola (38x31x17cm), cada gaiola contendo 12 plataformas (3,5 cm de diâmetro). Na mesma caixa, foi colocado um volume de água de 1 polegada de profundidade, obrigando os animais a permanecerem sobre as plataformas (figura 1). Os animais puderam, no entanto, mover-se livremente de uma plataforma para outra (Armani et al., 2012). Assim, quando os animais entraram na fase paradoxal do sono, devido à atonia muscular, acordavam ao cair na água. Comida e água

ficaram disponíveis *ad libitum*. O presente estudo adotou o período de 36 h de PSP, uma vez que este período de PSP aumenta o nível de atividade locomotora, que é considerado um comportamento maníaco, de animais utilizados em estudos anteriores (Armani et al., 2012). Os camundongos do grupo controle foram expostos às mesmas condições, exceto a água no fundo da caixa. Após o período de PSP, os animais foram colocados em uma gaiola com maravalha seca por cinco minutos e depois submetidos ao teste de campo aberto.

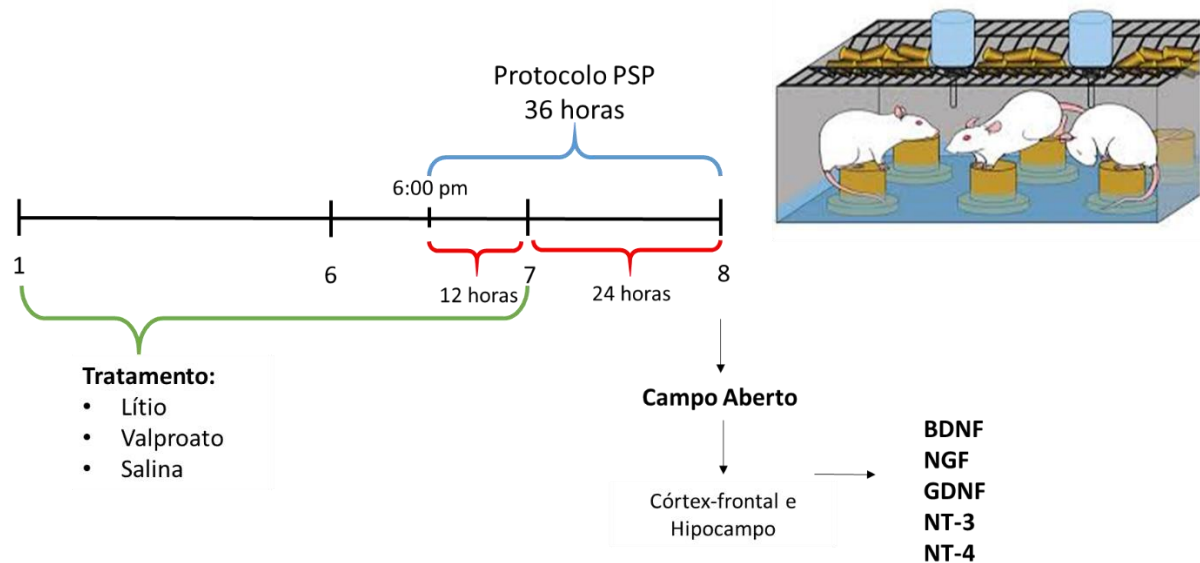


Figura 1: Desenho experimental do protocolo de Privação do Sono Paradoxal (PSP). BDNF: Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro; NGF: Fator de Crescimento Neural; GDNF: Fator Neurotrófico Derivado da Glia; NT-3: Neurotrofina-3; NT-4: Neurotrofina-4 (Do autor, 2019).

3.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos (n = 10 por grupo): (1) Controle + Sal; (2) Controle + Li; (3) Controle + VPA; (4) PSD + Sal; (5) PSD + Li; e (6) PSD + VPA.

3.5 TESTE DE CAMPO ABERTO

A atividade locomotora dos animais foi avaliada através do teste de campo aberto. Neste teste, os animais foram colocados em uma arena de madeira (40x40cm) cercados por paredes de madeira de 50cm de altura e contendo uma cobertura de vidro frontal. A parte inferior da arena de campo aberto foi dividida em 16 partes iguais com linhas pretas. Os animais foram cuidadosamente colocados no quadrante superior esquerdo e depois deixados para

explorar a arena por 5 min. O número de atividades horizontais (cruzamentos) e verticais (levantamentos) e o tempo que o animal permanece nos quadrantes centrais (comportamento de risco) realizados por cada animal, durante os 5 minutos foram então contabilizados (figura 2).



Figura 2: Representação dos parâmetros comportamentais avaliados no teste do campo aberto (Valvassori et al., 2017a).

3.6 AMOSTRAS CEREBRAIS

Imediatamente após o teste de campo aberto, os animais foram mortos por deslocamento cervical e o cérebro foi removido e dissecado em córtex frontal e hipocampo. Essas regiões cerebrais foram selecionadas por fazerem parte do sistema límbico, um conjunto interconectado de estruturas cerebrais centrais e corticais responsáveis pelo processamento do humor, emoção e memória (Patesta e Gartner, 2005). As amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C para análise dos níveis de neurotrofinas.

3.7 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

O conteúdo total de proteínas foi medido pelo método de Lowry e colaboradores (1951), usando albumina de soro bovino como padrão.

3.8 NÍVEIS DE FATORES NEUROTRÓFICOS

Para análise de fatores neurotróficos, os tecidos cerebrais foram homogeneizados em solução tampão fosfato (PBS) com fluoreto de fenilmetilsulfonilo 1 mM (PMSF) e ácido etilenoglicol bis (2-aminoetil éter)-N,N,N0N0-tetraacético (EGTA). Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 g por 20 min e os sobrenadantes foram coletados para quantificação dos

níveis de NGF, BDNF, GDNF, NT-3 e NT-4. Os níveis de NGF, BDNF, GDNF, NT-3 e NT-4 no córtex-frontal, hipocampo e estriado, foram medidos através de um ensaio imunoenzimático em sanduíche, usando kits comerciais de acordo com as instruções do fabricante (Chemicon[®], EUA).

Resumidamente, microplacas (fundo plano de 96 poços) foram revestidas durante 24h com as amostras diluídas 1:2 no diluente da amostra e a curva padrão. Em seguida, as placas foram lavadas quatro vezes com diluentes de amostra. Anticorpo monoclonal de coelho anti-BDNF, anti-NGF, anti-GDNF, anti-NT-3 ou anti-NT-4 diluídos 1:1000 em diluente de amostra foram incubados durante 3h à temperatura ambiente. Após a lavagem, foi realizado uma segunda incubação com anticorpo de coelho conjugado com peroxidase diluído 1:1000 durante 1h à temperatura ambiente. Após a adição da enzima estreptavidina, substrato e *stop solution*, determinou-se a quantidade de BDNF, NGF, GDNF, NT-3 e NT-4 por absorbância em 450nm. A curva padrão demonstra uma relação direta entre a densidade óptica (DO) e a concentração de BDNF, NGF, GDNF, NT-3 e NT-4.

3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O software utilizado nas análises estatísticas foi o STATISTICA 8 (Statsoft ©) e Prism 6 (GraphPad ©). O teste de Shapiro-wilk foi realizado para testar a normalidade dos dados. Todos os dados são apresentados como a média \pm S.E.M. As diferenças entre os grupos experimentais foram determinadas pela ANOVA de duas vias seguida pelo teste post hoc de Tukey. $P \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. As correlações foram analisadas pelo teste de correlação de Pearson. O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para analisar a força da relação entre variáveis contínuas.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISES COMPORTAMENTAIS

A figura 3 mostra os efeitos da PSP nos animais submetidos ao teste de campo aberto. Observou-se que a PSP aumentou o número de cruzamentos, o número de levantamentos e o número de visitas ao centro no teste do campo aberto. O pré-tratamento com Li diminuiu esses comportamentos do tipo maníacos induzidos pelo PSP, ou seja, preveniu as alterações comportamentais induzidas pelo PSP nos camundongos. A administração do VPA preveniu o aumento do número de cruzamentos, o aumento do número de levantamentos induzidos pela PSP no campo aberto. No entanto, o VPA bloqueou parcialmente o comportamento de risco dos animais (visitas ao centro). É importante notar que o tratamento com Li aumentou o número de visitas ao centro do campo aberto nos animais.

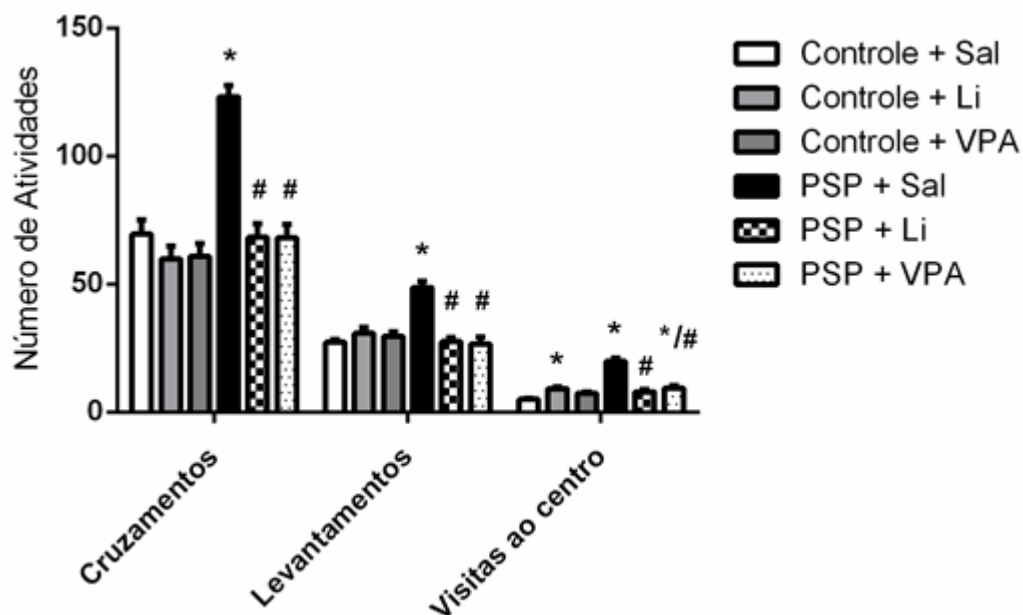


Figura 3: Efeito da administração de Li e VPA sobre o número de cruzamentos, levantamentos e visitas ao centro do teste de campo aberto em animais submetidos à privação do sono paradoxal ($n = 10$ por grupo). Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey quando F foi significativo. Os valores são expressos como média \pm SEM. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle. # $p < 0,05$ comparado com o grupo PSP.

ANOVA de duas vias revelou efeitos significativos do protocolo PSP [Cruzamentos: $F(1,42) = 30,06$, $p < 0,001$; Levantamentos: $F(1,42) = 8,65$, $p < 0,01$; Visitas ao centro: $F(1,42) = 50,89$, $p < 0,001$] e tratamento [Cruzamentos: $F(2,42) = 25,82$, $p < 0,001$; Levantamentos: $F(2,42) = 13,12$, $p < 0,001$; Visitas ao centro: $F(2,42) = 13,16$, $p < 0,001$] e

PSP \times tratamento [Cruzamentos: $F(2,42) = 13,16$, $p < 0,001$; Levantamentos: $F(2,42) = 22,23$, $p < 0,001$; Visitas ao centro: $F(2,42) = 44,48$, $p < 0,001$].

4.2 NÍVEIS DE BDNF

A Figura 4 demonstra os efeitos do pré-tratamento com Li e VPA sobre os níveis de BDNF no córtex-frontal e no hipocampo de camundongos submetidos a PSP. A PSP diminuiu os níveis de BDNF no córtex-frontal e no hipocampo dos animais. O tratamento com Li impediu as alterações induzidas pelo PSP, aumentando os níveis de BDNF em ambas as estruturas cerebrais avaliadas, quando comparado ao grupo PSP + Sal. Além disso, o pré-tratamento com VPA aumentou os níveis de BDNF em animais submetidos a PSP em ambas as estruturas cerebrais quando comparado com o grupo PSP + Sal. É importante notar que, no grupo PSP + VPA, o aumento do nível de BDNF no hipocampo foi significativamente maior do que no grupo Controle.

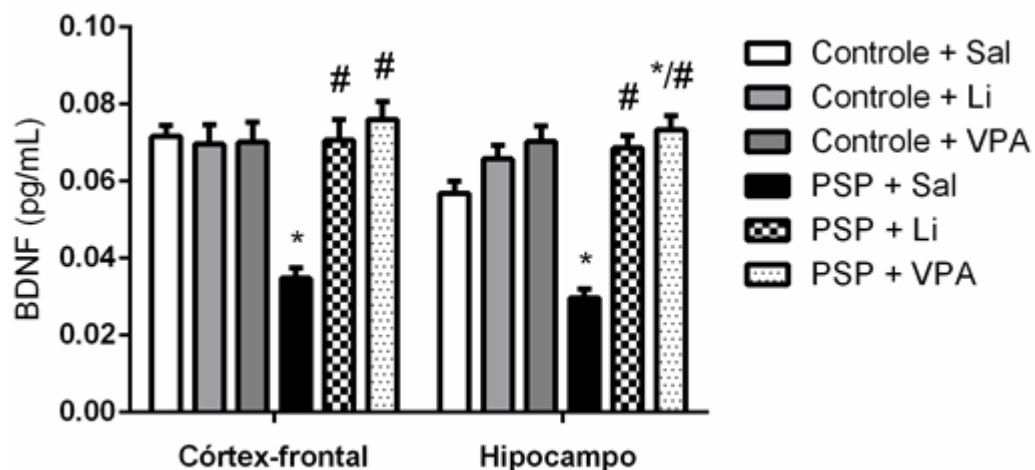


Figura 4: Efeitos da administração de Li e VPA sobre os níveis de BDNF no córtex-frontal e no hipocampo de animais submetidos à privação do sono paradoxal ($n = 6$ por grupo). Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey quando F foi significativo. Os valores são expressos como média \pm SEM. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle. # $p < 0,05$ comparado com o grupo PSP.

ANOVA de duas vias revelou efeitos significativos do protocolo PSP [BDNF = Córtex-frontal: $F(1,42) = 7,52$, $p < 0,01$; Hipocampo: $F(1,42) = 6,56$, $p < 0,05$] e tratamento [BDNF = Córtex-frontal: $F(2,42) = 11,57$, $p < 0,001$; Hipocampo: $F(2,42) = 40,51$, $p < 0,001$] e PSP \times tratamento [BDNF = Córtex-frontal: $F(2,42) = 13,73$, $p < 0,001$; Hipocampo: $F(2,42) = 13,12$, $p < 0,001$].

4.3 NÍVEIS DE NGF

A Figura 5 mostra o efeito da PSP e do pré-tratamento com Li e VPA em níveis de NGF no córtex-frontal e hipocampo de camundongos. Os animais que foram submetidos ao protocolo PSP mostram uma significativa redução nos níveis de NGF no córtex-frontal e no hipocampo. Li e VPA aumentaram os níveis de NGF em ambas as estruturas cerebrais dos animais submetidos a PSP em comparação com os do grupo de PSD + Sal.

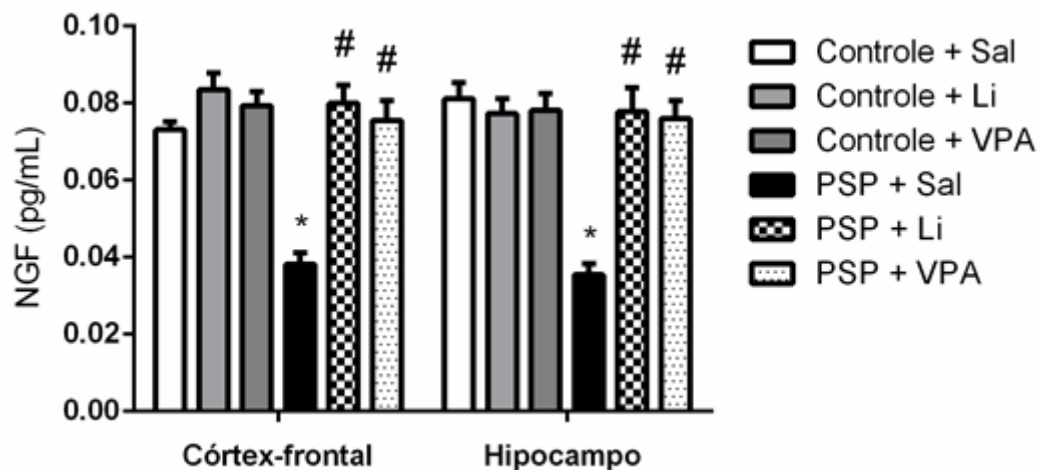


Figura 5: Efeito da administração de Li e VPA sobre os níveis de NGF no córtex-frontal e hipocampo de animais submetidos à privação do sono paradoxal ($n = 6$ por grupo). Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey quando F foi significativo. Os valores são expressos como média \pm SEM. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle. # $p < 0,05$ comparado com o grupo PSP.

ANOVA de duas vias revelou efeitos significativos do protocolo PSP [NGF = Córtex-frontal: $F(1,42) = 18,84$, $p < 0,001$; Hipocampo: $F(1,42) = 18,68$, $p < 0,001$] e tratamento [NGF = Córtex-frontal: $F(2,42) = 24,66$, $p < 0,001$; Hipocampo: $F(2,42) = 12,11$, $p < 0,001$] e PSP \times tratamento [NGF = Córtex-frontal: $F(2,42) = 10,25$, $p < 0,001$; Hipocampo: $F(2,42) = 16,93$, $p < 0,001$].

4.4 NÍVEIS DE NT-3

A Figura 6 mostra os resultados dos efeitos do pré-tratamento com Li e VPA nos níveis de NT-3 no córtex-frontal e no hipocampo de camundongos submetidos ao protocolo de PSP. Não encontramos diferenças significativas nos níveis de NT-3 em nenhum dos grupos experimentais ou estruturas cerebrais avaliadas.

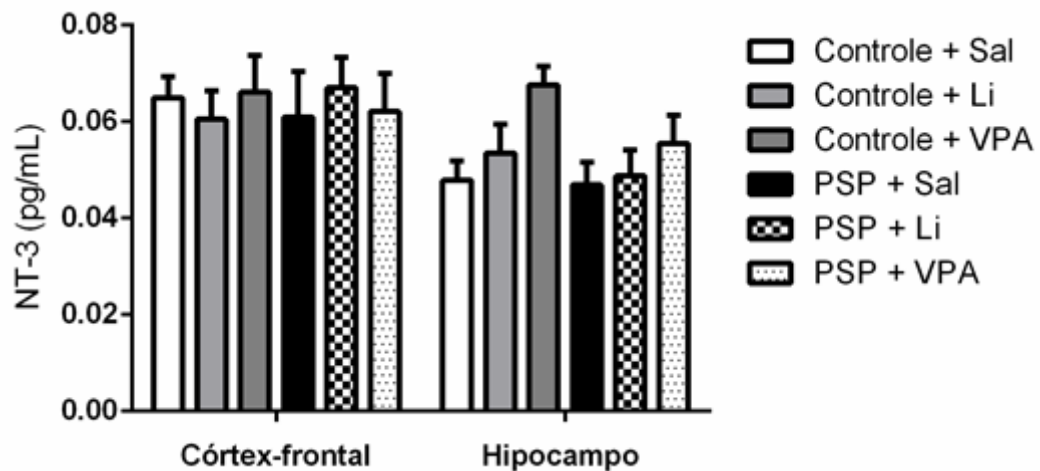


Figura 6: Efeito da administração de Li e VPA sobre os níveis de NT-3 no córtex-frontal e do hipocampo de animais submetidos à privação do sono paradoxal ($n = 6$ por grupo). Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey quando F foi significativo. Os valores são expressos como média \pm SEM. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle. # $p < 0,05$ comparado com o grupo PSP.

ANOVA de duas vias revelou efeitos significativos do protocolo PSP [NT3 = Córtex-frontal: $F(1,42) = 0,007$, $p = 0,93$; Hipocampo: $F(1,42) = 2,08$, $p = 0,16$] e o tratamento [NT-3 = Córtex-frontal: $F(2,42) = 0,01$, $p = 0,99$; Hipocampo: $F(2,42) = 4,27$, $p = 0,02$] e PSP \times tratamento [NT-3 = Córtex-frontal: $F(2,42) = 0,38$, $p = 0,68$; Hipocampo: $F(2,42) = 0,64$, $p = 0,53$].

4.5 NÍVEIS DE NT-4

A Figura 7 mostra os resultados dos efeitos de pré-tratamento com Li e VPA sobre os níveis de NT-4 no córtex-frontal e hipocampo de camundongos submetidos ao protocolo de PSP. Não foi encontrada diferenças significativas nos níveis de NT-4 em nenhum dos grupos experimentais ou estruturas cerebrais estudadas.

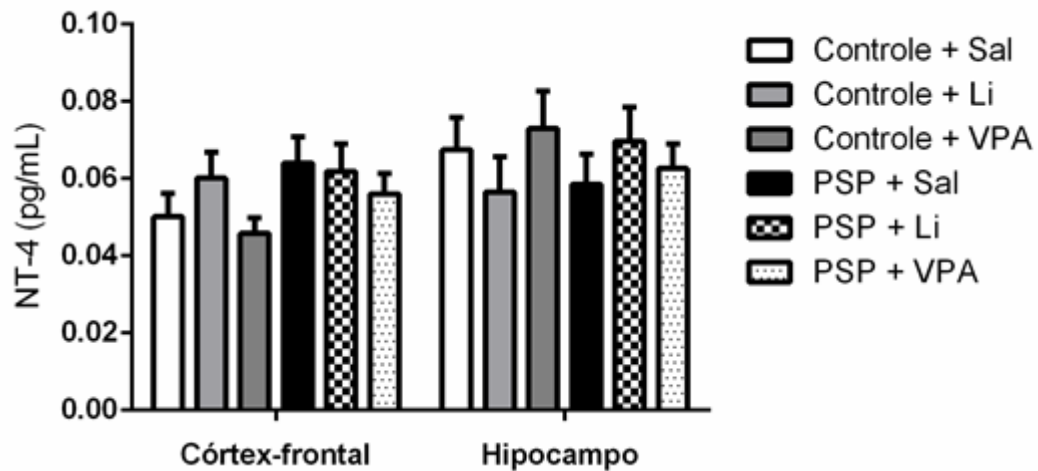


Figura 7: Efeito de administração de Li e VPA em NT-4 níveis no córtex frontal e hipocampo de animais submetidos à privação do sono paradoxal (n = 6 por grupo). Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey quando F foi significativo. Os valores são expressos como média \pm SEM. * p < 0,05 comparado com o grupo controle. # p < 0,05 comparado com o grupo PSP.

ANOVA de duas vias revelou efeitos significativos do protocolo PSP [NT4 = CórteX-frontal: $F(1,42) = 2,97$, $p = 0,09$; Hipocampo: $F(1,42) = 0,09$, $p = 0,77$] e o tratamento [NT-4 = CórteX-frontal: $F(2,42) = 1,39$, $p = 0,26$; Hipocampo: $F(2,42) = 0,21$, $p = 0,81$] e PSP \times tratamento [NT-4 = CórteX-frontal: $F(2,42) = 0,51$, $p = 0,60$; Hipocampo: $F(2,42) = 1,19$, $p = 0,31$].

4.6 NÍVEIS DE GDNF

A figura 8 mostra os resultados de pré-tratamento com Li e VPA sobre os níveis de GDNF no córtex-frontal e hipocampo de camundongos submetidos a PSP. A PSP induziu uma diminuição nos níveis de GDNF no córtex-frontal e no hipocampo dos animais quando comparado com os do grupo Controle + Sal. Além disso, o tratamento com Li e VPA impediu as alterações induzidas pela PSP, aumentando os níveis de GDNF em ambas as estruturas cerebrais avaliadas em camundongos submetidos a PSP quando comparado com o grupo PSP + Sal. No entanto, a administração de VPA aumentou os níveis de GDNF no hipocampo de camundongos quando comparado ao grupo controle.

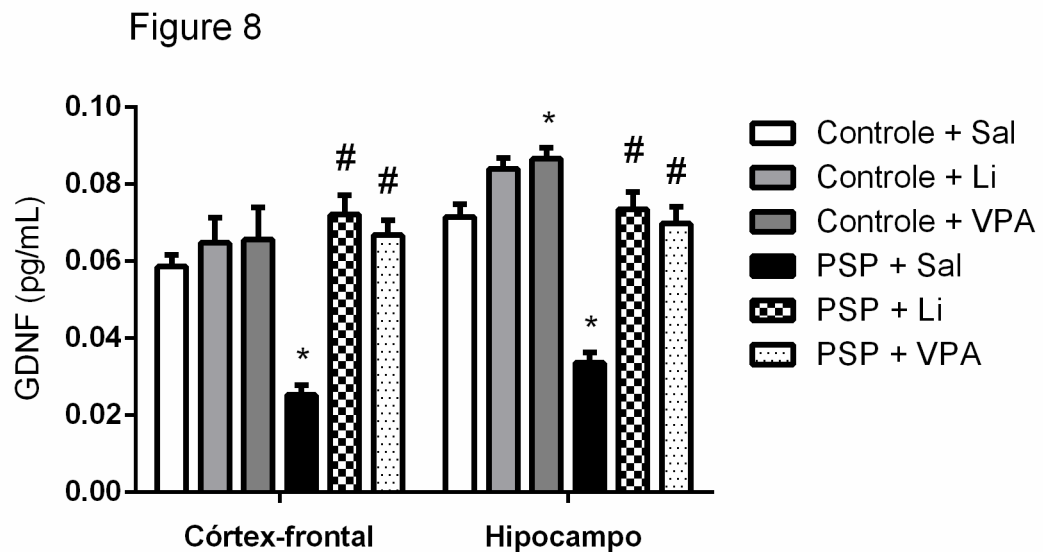


Figura 8: Efeito da administração de Li e VPA sobre os níveis de GDNF no córtex frontal e hipocampo de animais submetidos à privação do sono paradoxal ($n = 6$ por grupo). Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey quando F foi significativo. Os valores são expressos como média \pm SEM. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle. # $p < 0,05$ comparado com o grupo PSP.

A ANOVA de duas vias revelou efeitos significativos do protocolo PSP [GDNF = CórTEX Frontal: $F(1,42) = 3,62$, $p = 0,06$; Hipocampo: $F(1,42) = 57,60$, $p < 0,001$] e tratamento [GDNF = CórTEX Frontal: $F(2,42) = 15,15$, $p < 0,001$; Hipocampo: $F(2,42) = 36,40$, $p < 0,001$] e PSP \times tratamento [GDNF = CórTEX Frontal: $F(2,42) = 8,45$, $p < 0,001$; Hipocampo: $F(2,42) = 8,34$, $p = 0,01$].

4.7 CORRELAÇÃO ENTRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA E OS NÍVEIS DE FATORES NEUROTROFICOS

A correlação entre o número de cruzamentos e os níveis de BDNF é demonstrada na figura 9. Os níveis de BDNF no córtex-frontal (Figura 9 A) e no hipocampo (Figura 9 B) dos camundongos foram negativamente correlacionados com o número de cruzamentos, correlação de Pearson para BDNF: [córtex-frontal ($n = 36$; $R^2 = 0,4450$; $p < 0,0001$), hipocampo ($N = 36$; $R^2 = 0,4195$; $p < 0,0001$)].

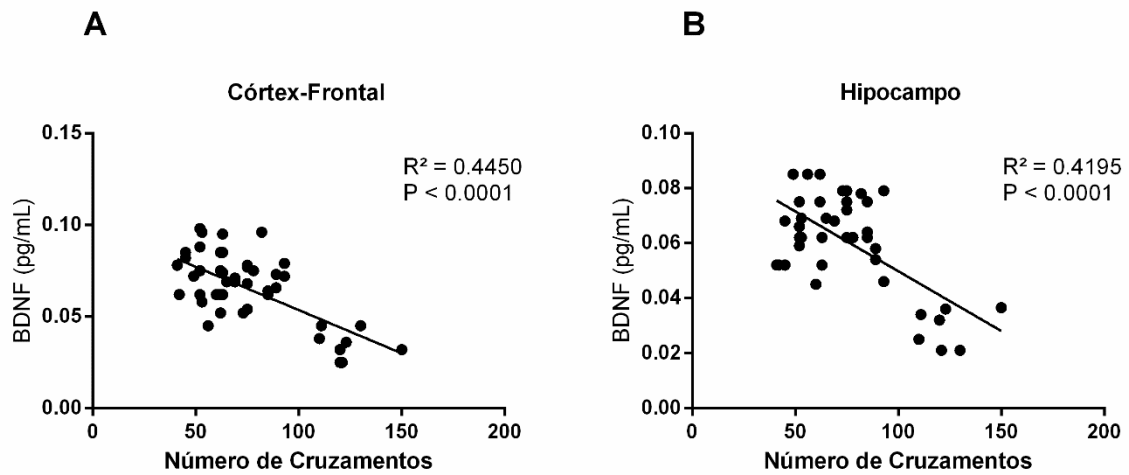
Figura 9

Figura 9: Correlações entre o número de cruzamentos e níveis de BDNF no córtex-frontal (a), e hipocampo (b) de camundongos submetidos à privação de sono paradoxal. Os resultados foram avaliados utilizando o teste de correlação de Pearson.

A figura 10 demonstra a correlação entre o número de cruzamentos e níveis de NGF. Os níveis de NGF no córtex frontal (Figura 10 A) e no hipocampo (Figura 10 B) dos camundongos foram negativamente correlacionados com o número de cruzamentos, correlação de Pearson para NGF: [córtex-frontal ($n = 36$; $r^2 = 0,5258$; $p < 0,0001$), hipocampo ($n = 36$; $R^2 = 0,5562$; $p < 0,0001$)].

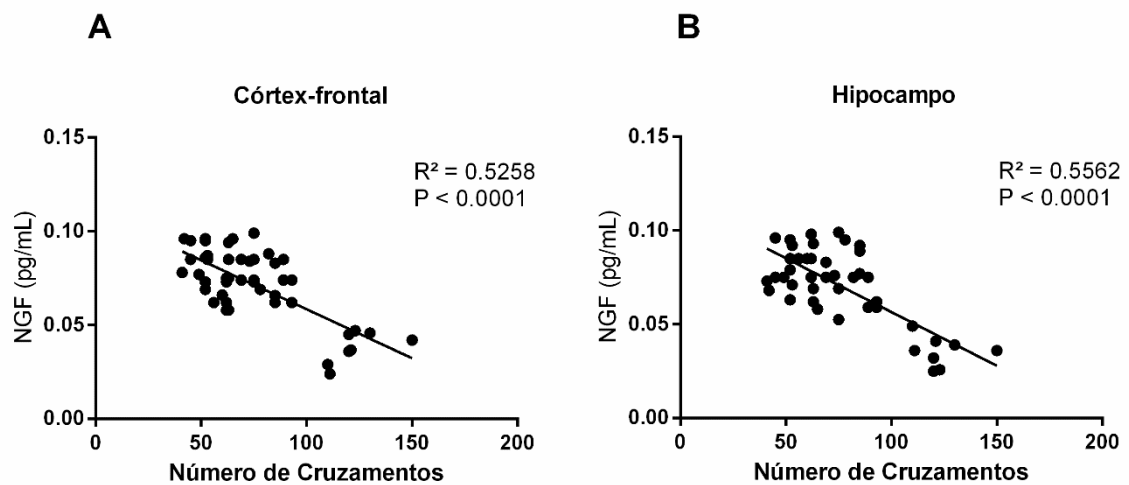
Figura 10

Figura 10: Correlações entre o número de cruzamentos e níveis de NGF no córtex-frontal (a), e hipocampo (b) de camundongos submetidos à privação de sono paradoxal. Os resultados foram avaliados utilizando o teste de correlação de Pearson.

A figura 11 demonstra a correlação entre o número de cruzamentos e níveis de NT-3 no córtex frontal (Figura 11 A) e no hipocampo (Figura 11 B) de camundongos. Verificou-se que os níveis de NT-3 no córtex frontal dos animais não se correlacionam com o número de cruzamentos; contudo, no hipocampo, os níveis de NT-3 foram negativamente correlacionados com o número de cruzamentos, correlação de Pearson para NT-3: [córtex-frontal (n = 36; $r^2 = 0,01778$; $p = 0,3715$), hipocampo (n = 36; $r^2 = 0,1009$, $p = 0,0278$)].

Figura 11

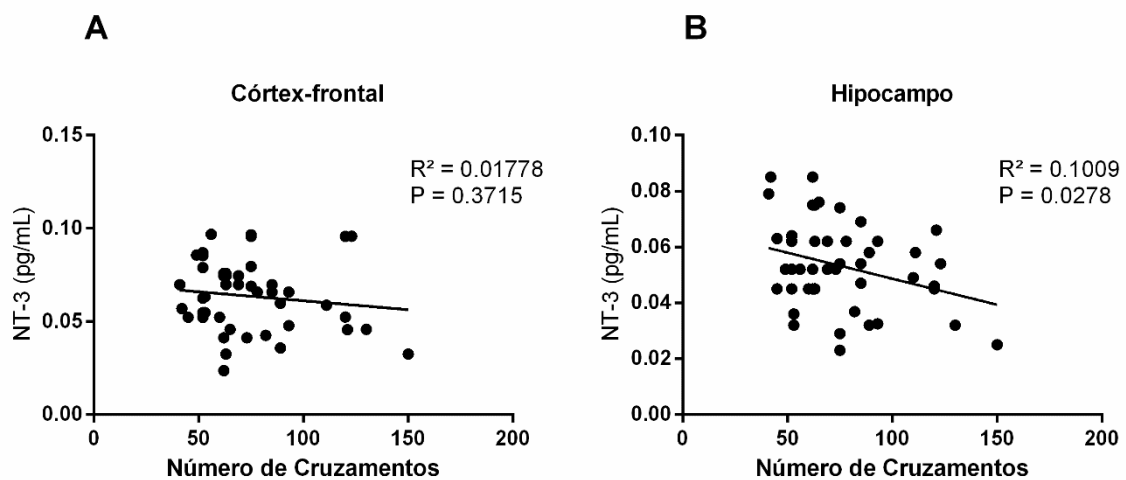


Figura 11: Correlações entre o número de cruzamentos e níveis de NT-3 no córtex frontal (a), e hipocampo (b) de ratos submetidos à privação de sono paradoxal. Os resultados foram avaliados utilizando o teste de correlação de Pearson.

A Figura 12 demonstra a correlação dos níveis de NT-4 com o número de cruzamentos. Não houve correlação em qualquer estrutura avaliada, como pode ser visto na figura 10A (córtex frontal) e figura 10B (Hipocampo), correlação de Pearson para NT-4: [córtex frontal (n = 36; $r^2 = 0,03884$; $p = 0,1794$), hipocampo (n = 36; $r^2 = 0,04743$; $p = 0,1463$)].

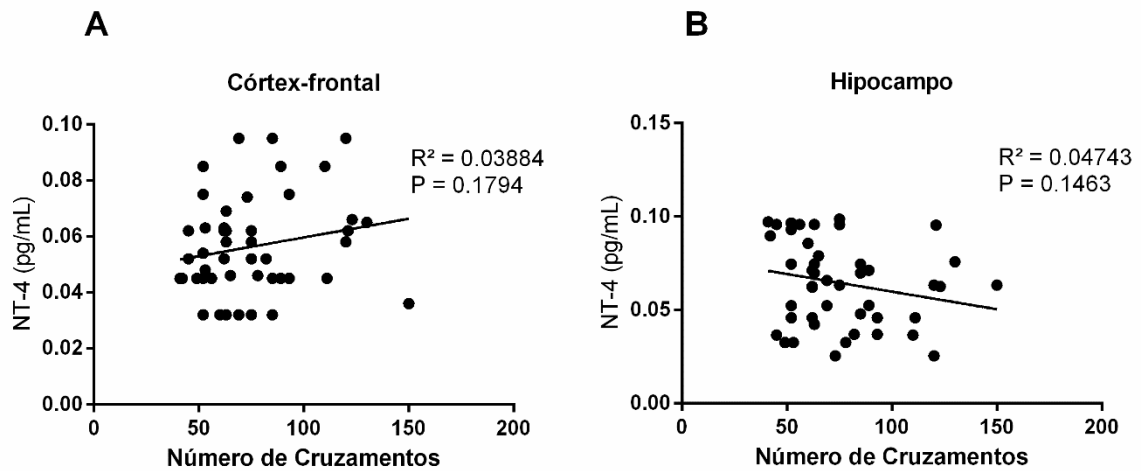
Figura 12

Figura 12: Correlações entre o número de cruzamentos e níveis de NT-4 no córtex-frontal (a), e hipocampo (b) de camundongos submetidos à privação de sono paradoxal. Os resultados foram avaliados utilizando o teste de correlação de Pearson.

A correlação entre o número de cruzamentos e níveis de GDNF é demonstrada na figura 13. Os níveis de GDNF no córtex frontal (Figura 13 A) e no hipocampo (Figura 13 B) de camundongos foram negativamente correlacionados com o número de cruzamentos, correlação de Pearson para o GDNF: [córtex-frontal (n = 36; R² = 0,2085; p = 0,0011), hipocampo (N = 36; R² = 0,6032; p <0,0001)].

Figura 13

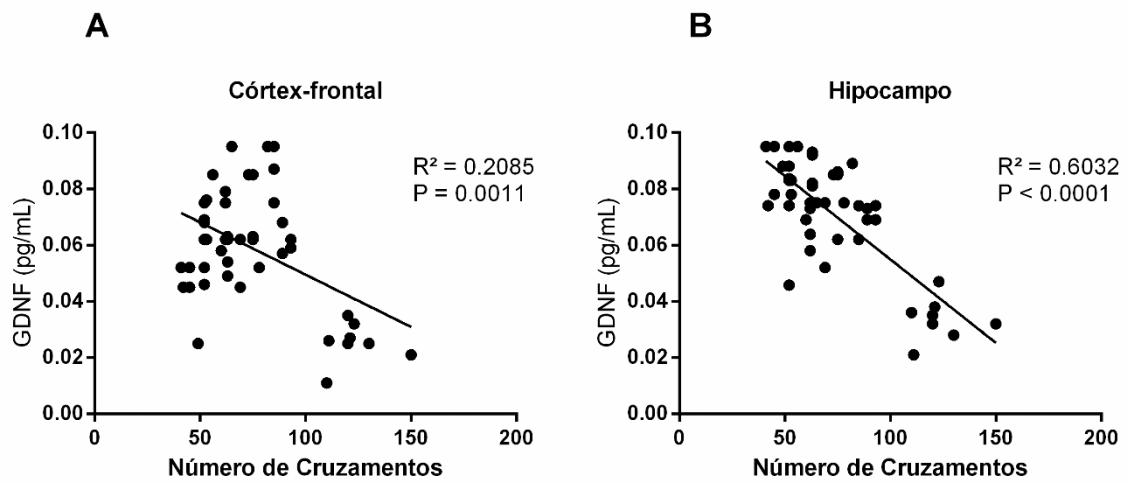


Figura 13: Correlações entre o número de cruzamentos e níveis de GDNF no córtex-frontal (a), e hipocampo (b) de camundongos submetidos à privação de sono paradoxal. Os resultados foram avaliados utilizando o teste de correlação de Pearson.

5 DISCUSSÃO

A PSP pode induzir mania em indivíduos saudáveis e exacerbar episódios maníacos ou levar a uma mudança de depressão para mania em pacientes bipolares (Kaplan e Harvey, 2013). Sendo assim, a PSP tem sido considerada um bom modelo animal de mania por induzir alguns aspectos de um episódio maníaco em roedores, como hiperatividade, hipersexualidade e comportamento agressivo (Gessa et al., 1995, Benedetti et al., 2008).

No presente estudo, a PSP induziu comportamentos que são considerados do tipo maníacos, como hiperatividade e comportamento de risco, em camundongos. Além disso, a PSP diminuiu os níveis de BDNF, NGF e GDNF no córtex-frontal e no hipocampo de camundongos. A administração de Li e VPA protegeu contra alterações comportamentais e danos bioquímicos no cérebro de animais induzidos pela PSP. No entanto, o PSP e a administração de Li ou VPA não afetaram os níveis de NT-3 e NT-4 nas estruturas cerebrais avaliadas. De fato, já foi descrito na literatura que o PSP induz hiperatividade e comportamentos de risco em ratos (Radhakrishnan et al., 2015; Valvassori et al., 2017c; Arent et al., 2015; Streck et al., 2015). De fato, em episódios maníacos e depressivos, a insônia ou diminuição da necessidade de sono e hipersonia foram observados em pacientes com TB (American Psychiatric Association, 2013; Kaplan e Harvey, 2013). A privação do sono pode induzir comportamentos do tipo maníaco em indivíduos saudáveis e piorar episódios maníacos nos pacientes com TB (Kaplan e Harvey, 2013). É importante notar que os ritmos circadianos e os genes que compõem o relógio biológico estão associados ao TB. Diferentemente dos modelos farmacológicos, o PSP induz comportamentos maníacos, reproduzindo uma teoria etiológica, que induz alterações fisiopatológicas, ambos observados no TB, tornando este modelo, talvez, o mais eficaz na imitação da mania bipolar humana.

Efeitos dos estabilizadores de humor no modelo animal de mania		Efeitos da PSP		Efeitos do Li		Efeitos do VPA	
Parâmetros Comportamentais	Cruzamentos	↑		↓		↓	
	Levantamentos	↑		↓		↓	
	Visitas ao centro	↑		↓		↓	
Análises Bioquímicas		CF	HIP	CF	HIP	CF	HIP
	BDNF	↓	↓	↑	↑	↑	↑
	NGF	↓	↓	↑	↑	↑	↑
	NT3	-	-	-	-	-	-
	NT4	-	-	-	-	-	-
	GDNF	↓	↓	↑	↑	↑	↑
Legenda:	↑ Aumentou		↓ Diminuiu		- Não teve efeito		

Figura 14 – Efeitos dos estabilizadores de humor Lítio (Li) e Valproato de Sódio (VPA) no modelo animal de mania induzido por Privação do Sono Paradoxal (PSP) sobre os parâmetros comportamentais e parâmetros bioquímicos no córtex-frontal (CF) e hipocampo (HIP) dos animais. BDNF: Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro; NGF: Fator de Crescimento Neural; NT-3: Neurotrofina-3; NT-4: Neurotrofina-4; GDNF: Fator Neurotrófico Derivado da Glia.

Estudos anteriores também mostraram que os estabilizadores de humor evitavam alterações comportamentais induzidas pelo PSP (Valvassori et al., 2017c; Arent et al., 2015; Streck et al., 2015). Wisor et al. (2008) demonstraram que a PSP bloqueia a expressão do gene CLOCK no cérebro, aumentando os níveis de TNF α . Curiosamente, o Li protege contra aumentos de TNF α induzidos por PSP no cérebro de ratos (Valvassori et al., 2017b). Além disso, o Li pode normalizar a ansiedade em camundongos com a mutação CLOCK Δ 19 (um gene envolvido no ritmo circadiano) (Kristensen et al., 2018; Coque et al., 2011). No presente estudo, a administração de Li aumentou o número de visitas ao centro no campo aberto, sugerindo uma diminuição da ansiedade nos animais. Uma possível explicação para os efeitos terapêuticos de Li poderia ser seus efeitos sobre o TNF α e, conseqüentemente, na proteção do cérebro contra alterações do gene CLOCK induzidos pela PSP.

Assim como no presente estudo, outros trabalhos mostraram que os animais submetidos a PSP apresentaram diminuição dos níveis de BDNF no córtex-frontal e no hipocampo. Os estabilizadores de humos, Li e VPA protegeram contra essa alteração neurotrófica induzida pela PSP. As funções neurotróficas estão associadas a várias funções fisiológicas, incluindo o sono (Fragana et al., 2008). Por sua vez, transtornos do sono, como insônia e a privação do sono, podem estar relacionados a alterações nos níveis de fatores neurotróficos (Schmitt et al., 2016). De fato, estudos anteriores demonstraram que indivíduos que sofrem de insônia exibiram níveis séricos reduzidos de BDNF em comparação com os

controles saudáveis. Além disso, os níveis séricos de BDNF foram correlacionados com a gravidade da insônia (Giese et al., 2013, 2014).

A PSP tem sido considerada um estressor ambiental que pode levar à ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (Schmitt et al., 2016; Han et al., 2012; Valvassori et al., 2017b). A literatura mostra que a desregulação do eixo HPA pode levar a alterações do sono e diminuição dos níveis de fatores neurotróficos. Portanto, o sono pode ser um mediador crucial da relação entre estresse e níveis de fatores neurotróficos, sendo que as alterações do sono podem levar a reduções nos níveis de fatores neurotróficos, como os níveis de BDNF (Schmitt et al., 2016). Um estudo anterior do nosso grupo de pesquisa descobriu que animais submetidos a PSP apresentaram aumento dos níveis de corticosterona e do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (Valvassori et al., 2017b). Chaves et al. (2019) demonstraram que a administração de corticosterona em camundongos diminuiu os níveis de BDNF no hipocampo. Portanto, pode-se sugerir que o aumento da corticosterona em animais com PSP possa estar associado à diminuição do nível de BDNF observada no presente estudo.

Em um estudo anterior, o Li protegeu contra alterações nos níveis séricos de corticosterona e de ACTH em camundongos submetidos à PSP (Valvassori et al., 2017b). Portanto, uma possível hipótese é que, modulando o eixo HPA, o Li aumentou os níveis de BDNF como demonstrado no presente estudo. Além disso, vários estudos demonstraram os efeitos do Li e do VPA no BDNF no cérebro de animais submetidos a modelos animais de mania (Frey et al., 2006; Jornada et al., 2010). Frey et al. (2006) mostraram que Li e VPA revertem a diminuição dos níveis de BDNF induzidos por anfetamina no cérebro de ratos. Por sua vez, Jornada e colaboradores (2010) mostraram que, além de seus efeitos antimaníacos, Li e VPA também protegem o cérebro de ratos contra a diminuição dos níveis de BDNF induzidos pela ouabaína (OUA). Juntamente com nossos resultados, esses estudos sugerem que comportamentos maníacos são acompanhados por uma diminuição dos níveis de BDNF e que os efeitos terapêuticos de estabilizadores de humor incluem a modulação dos níveis dessa neurotrofina.

No presente estudo pode-se observar também que a PSP diminuiu os níveis de NGF no córtex-frontal e no hipocampo dos ratos. O tratamento com Li ou VPA impediram alterações nos níveis de NGF induzidas pela PSP. De acordo com os resultados do presente estudo, outro estudo pré-clínico demonstrou que roedores submetidos a PSP apresentaram reduções nos níveis de NGF (Sei et al., 2000). O NGF é um regulador essencial do desenvolvimento e sobrevivência neuronal (Levi-Montalcini e Angeletti, 1968). Um estudo anterior demonstrou que indivíduos com TB que estavam em episódio maníaco, apresentavam níveis mais baixos de

NGF do que pacientes eutímicos ou controles saudáveis (Barbosa et al., 2011b). Um estudo pré-clínico também mostrou reduções nos níveis de NGF em ratos com comportamentos do tipo maníacos induzidos pela OUA (Varela et al., 2015). Varela et al. (2015) demonstraram que a administração de Li e VPA reverteram as alterações nos níveis de NGF no córtex-frontal de ratos que apresentaram comportamento maníaco induzido por OUA. Portanto, a modulação do NGF parece ser um alvo importante para os estabilizadores do humor, protegendo o cérebro de pacientes com TB.

Os efeitos do GDNF estão associados a neurônios dopaminérgicos (Lin et al., 1993; Ogłodek et al., 2016). Diminuições nos níveis de GDNF foram relatadas no sangue de pacientes com TB durante episódios maníacos (Takebayashi et al., 2006). No presente estudo, a diminuição nos níveis de GDNF foram acompanhadas por comportamentos maníacos. O Li e o VPA impediram o comportamento maníaco induzido pelo PSP e protegeram os cérebros dos animais contra as diminuições do GDNF. Um estudo anterior demonstrou que o tratamento com Li ou VPA reverteu e impediu o comportamento maníaco e aumentou os níveis de GDNF no cérebro de ratos submetidos à administração de OUA (Varela et al., 2015). Esses achados sugerem uma relação entre o comportamento maníaco e alterações nos níveis de GDNF e que os efeitos terapêuticos de Li e VPA estão associados a modulação deste fator neurotrófico.

Limitações do estudo: Os autores discutem alguns pontos do manuscrito usando alterações do ritmo circadiano, mas o próprio ritmo circadiano não foi avaliado neste estudo. No entanto, o sono faz parte do ritmo circadiano, uma vez que é o período total de um dia; conseqüentemente, a PSP afeta o ritmo circadiano. O presente estudo não utilizou ratos fêmeas; entretanto, outros estudos precisam ser realizados para avaliar as diferenças entre os sexos dos efeitos da PSP sobre os fatores neurotróficos.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, alterações no sono através do protocolo de PSP induziram comportamento do tipo maníaco e induziu alterações nos níveis de fatores neurotróficos em camundongos. A administração de Li ou de VPA protegeu as alterações comportamentais e neurotróficas induzidas pela PSP. Portanto, parece que os fatores neurotróficos e o sono são alvos essenciais para tratar o TB. No entanto, mais estudos são necessários para entender melhor esses mecanismos.

REFERÊNCIAS

- American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical. Manual of Mental Disorders. 5th ed. Washington, DC: American Psychiatric Publishing; 2013.
- Armani F, Andersen ML, Andreatini R, Frussa-Filho R, Tufik S, Fernandes JC. Successful combined therapy with tamoxifen and lithium in a paradoxical sleep deprivation-induced mania model. *CNS neuroscience & therapeutics*. 2012; 18(2), 119-125.
- Barbosa IG, Huguet RB, Neves FS, Reis HJ, Bauer ME, Janka Z, Palotás A, Teixeira AL. Impaired nerve growth factor homeostasis in patients with bipolar disorder. *World J Biol Psychiatry*. 2011a; 12(3):228-32.
- Barbosa IG, Huguet RB, Sousa LP, Abreu MN, Rocha NP, Bauer ME, Carvalho LA, Teixeira AL. Circulating levels of GDNF in bipolar disorder. *Neurosci Lett*. 2011b; 502(2):103-6.
- Barbosa IG, Morato IB, Huguet RB, Rocha FL, Machado-Vieira R, Teixeira AL. Decreased plasma neurotrophin-4/5 levels in bipolar disorder patients in mania. *Braz J Psychiatry*. 2014; 36(4):340-3.
- Bartkowska K, Turlejski K, Djavadian RL. Neurotrophins and their receptors in early development of the mammalian nervous system. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2010; 70(4):454-67.
- Benedetti F, Fresi F, Maccioni P, Smeraldi E. Behavioural sensitization to repeated sleep deprivation in a mice model of mania. *Behav Brain Res*. 2008; 187(2):221-227.
- Beyer DKE, Freund N. Animal models for bipolar disorder: from bedside to the cage. *Int J Bipolar Disord*. 2017;5(1):35.
- Boger HA, Middaugh LD, Huang P, Zaman V, Smith AC, Hoffer BJ, Tomac AC, Granholm AC. A partial GDNF depletion leads to earlier age-related deterioration of motor function and tyrosine hydroxylase expression in the substantia nigra. *Exp Neurol*. 2006; 202(2):336-47.
- Cechinel-Recco K, Valvassori SS, Varela RB, Resende WR, Arent CO, Vitto MF, Luz G, de Souza CT, Quevedo J. Lithium and tamoxifen modulate cellular plasticity cascades in animal model of mania. *J Psychopharmacol*. 2012; 26(12):1594-604.
- Cirulli F, Alleva E. The NGF saga: from animal models of psychosocial stress to stress-related psychopathology. *Front Neuroendocrinol*. 2009; 30(3):379-95.
- Coelho CAO. Comparação de registros de sono (EEG e EMG) lidos em épocas de 10 e 30 segundos de ratos submetidos a privação de sono e tarefa de esquiva inibitória. Monografia. Universidade do Estado de São Paulo. 2009.
- Chalazonitis A. Neurotrophin-3 in the development of the enteric nervous system. *Prog Brain Res*. 2004; 146:243-63.
- Craddock N, O'Donovan MC, Owen MJ. The genetics of schizophrenia and bipolar disorder: dissecting psychosis. *J Med Genet*. 2005; 42(3):193-204.

Cunha AB, Frey BN, Andreazza AC, Goi JD, Rosa AR, Goncalves CA, Santin A, Kapczinski F. Serum brain-derived neurotrophic factor is decreased in bipolar disorder during depressive and manic episodes. *Neurosci Lett*. 2006; 398:215-9.

de Oliveira GS, Ceresér KM, Fernandes BS, Kauer-Sant'Anna M, Fries GR, Stertz L, Aguiar B, Pfaffenseller B, Kapczinski F. Decreased brain-derived neurotrophic factor in medicated and drug-free bipolar patients. *J Psychiatr Res*. 2009; 43(14):1171-4.

Delgado VB, Kapczinski F, Chaves MLF. Memory mood congruency phenomenon in bipolar I disorder and major depression disorder patients. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2012; 45(9):856-861.

Ellenbroek BA; Cools AR. Animal models with construct validity for schizophrenia. *Behavioural pharmacology* 1990; 6(1):469-490.

Fernandes BS, Gama CS, Cereser KM, Yathan LN, Fries GR, Colpo G, de Lucena D, Kunz M, Gomes FA, Kapczinski F. Brain-derived neurotrophic factor as a state-marker of mood episodes in bipolar disorders: a systematic review and meta-regression analysis. *J Psychiatr Res*. 2011; 45(8):995-1004.

Frey BN, Valvassori SS, Réus GZ, Martins MR, Petronilho FC, Bardini K, Dal-Pizzol F, Kapczinski F, Quevedo J. Effects of lithium and valproate on amphetamine-induced oxidative stress generation in an animal model of mania. *J Psychiatry Neurosci*. 2006a;31(5):326-32.

Frey BN, Andreazza AC, Ceresér KM, Martins MR, Valvassori SS, Réus GZ, Quevedo J, Kapczinski F. Effects of mood stabilizers on hippocampus BDNF levels in an animal model of mania. *Life Sci*. 2006b;79(3):281-6.

Gama CS, Kunz M, Magalhães PVS, Kapczinski F. Staging and neuroprogression in bipolar disorder: a systematic review of the literature. *Rev Bras Psiquiatr*. 2013; 35:70-4.

Gessa, GL, Pani, L, Fadda P, Fratta W. Sleep deprivation in the rat: an animal model of mania. *Eur Neuropsychopharmacol*. 1995; 5:89-93

Giglio LM, Magalhães PV, Andersen ML, Walz JC, Jakobson L, Kapczinski F. Circadian preference in bipolar disorder. *Sleep Breath*. 2010;14(2):153-5.

Gómez-Palacio-Schjetnan A, Escobar ML. Neurotrophins and synaptic plasticity. *Curr Top Behav Neurosci*. 2013;15:117-36.

Gomes F, Souza ME. Tratamento do transtorno bipolar: eutimia. *Archives of Clinical Psychiatry*. 2005;32(1):63-70.

Granholt AC, Reyland M, Albeck D, Sanders L, Gerhardt G, Hoernig G, Shen L, Westphal H, Hoffer B. Glial cell line-derived neurotrophic factor is essential for postnatal survival of midbrain dopamine neurons. *J Neurosci*. 2000; 20(9):3182-90.

Harrison PJ, Geddes JR, Tunbridge EM. The Emerging Neurobiology of Bipolar Disorder. *Trends Neurosci*. 2018;41(1):18-30.

Huang TL, Hung YY, Lee CT, Chen RF. Serum protein levels of brain-derived neurotrophic factor and tropomyosin-related kinase B in bipolar disorder: effects of mood stabilizers. *Neuropsychobiology*. 2012; 65(2):65-9.

Jawad I, Watson S, Haddad PM, Talbot PS, McAllister RH. Medication nonadherence in bipolar disorder: a narrative review. *Ther Adv Psychopharmacol*. 2018;8(12):349-363.

Jornada LK, Moretti M, Valvassori SS, Ferreira CL, Padilha PT, Arent CO, Fries GR, Kapczinski F, Quevedo J. Effects of mood stabilizers on hippocampus and amygdala BDNF levels in an animal model of mania induced by ouabain. *J Psychiatr Res*. 2010;44(8):506-10.

Justo LP, Calil HM. Intervenções psicossociais no transtorno bipolar. *Archives of Clinical Psychiatry*. 2004;31(2):91-99.

Kaltenboeck A, Winkler D, Kasper S. Bipolar and related disorders in DSM-5 and ICD-10. *CNS Spectr*. 2016; 21(4):318-23.

Kang HJ, Schuman EM. Neurotrophin-induced modulation of synaptic transmission in the adult hippocampus. *J Physiol Paris*. 1995; 89(1):11-22.

Kaplan KA, Harvey AG. Behavioral treatment of insomnia in bipolar disorder. *Am J Psychiatry*. 2013; 170(7):716-720.

Korte M, Carroll P, Wolf E, Brem G, Thoenen H, Bonhoeffer T. Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92(19):8856-60.

Levi-Montalcini R, Angeletti PU. Nerve growth factor. *Physiol Rev*. 1968; 48(3):534-69. Review.

Loch AA, Zanetti MV, de Sousa RT, Chaim TM, Serpa MH, Gattaz WF, Teixeira AL, Machado-Vieira R. Elevated neurotrophin-3 and neurotrophin 4/5 levels in unmedicated bipolar depression and the effects of lithium. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2015; 56:243-6.

Logan RW, McClung CA. Animal models of bipolar mania: The past, present and future. *Neuroscience*. 2016;321:163-188.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265-275.

Manji HK, Chen G. Post-receptor signaling pathways in the pathophysiology and treatment of mood disorders. *Curr Psychiatry Rep*. 2000; 2(6):479-89.

McAllister AK. Subplate neurons: a missing link among neurotrophins, activity, and ocular dominance plasticity? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(24):13600-2.

McCracken JT. The epidemiology of child and adolescent mood disorders. *Child and Adolescent Psychiatric Clinics*. 1992;1(1):53-72.

Moreno RA, Moreno D H, Ratzke R. Diagnóstico, tratamento e prevenção da mania e da hipomania no transtorno bipolar. *Rev Psiq Clín.* 2005;32(1):39-48.

Pascual A, Hidalgo-Figueroa M, Piruat JI, Pintado CO, Gómez-Díaz R, López-Barneo J. Absolute requirement of GDNF for adult catecholaminergic neuron survival. *Nat Neurosci.* 2008; 11(7):755-61.

Patesta, MA, Gartner LP. "Limbic system". In: *A textbook of neuroanatomy.* First ed. Oxford: Blackwell Publishing. Malden. 2005;344-359.

Robillard R, Naismith SL, Hickie IB. Recent advances in sleep-wake cycle and biological rhythms in bipolar disorder. *Curr Psychiatry Rep.* 2013;15(10):402.

Sanches R, Assunção S, Hetem L. Impacto da comorbidade no diagnóstico e tratamento do transtorno bipolar. *Rev Psiquiatr Clin.* 2005;32(1):71-77.

Sani G, Perugi G, Tondo L. Treatment of Bipolar Disorder in a Lifetime Perspective: Is Lithium Still the Best Choice? *Clin Drug Investig.* 2017;37(8):713-727.

Scola G, Andreazza AC. The role of neurotrophins in bipolar disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2015;56:122-128.

Sohrabji F, Lewis DK. Estrogen-BDNF interactions: implications for neurodegenerative diseases. *Front Neuroendocrinol.* 2006; 27(4):404-14.

Streck EL, Scaini G, Jeremias GC, Rezin GT, Gonçalves CL, Ferreira GK, Réus GZ, Resende WR, Valvassori SS, Kapczinski F, Andersen ML, Quevedo J. Effects of Mood Stabilizers on Brain Energy Metabolism in Mice Submitted to an Animal Model of Mania Induced by Paradoxical Sleep Deprivation. *Neurochem Res.* 2015;40(6):1144-1152.

Soontornniyomkij B, Everall IP, Chana G, Tsuang MT, Achim CL, Soontornniyomkij V. Tyrosine kinase B protein expression is reduced in the cerebellum of patients with bipolar disorder. *J Affect Disord.* 2011; 133(3):646-54.

Thompson Ray M, Weickert CS, Wyatt E, Webster MJ. Decreased BDNF, trkB-TK+ and GAD67 mRNA expression in the hippocampus of individuals with schizophrenia and mood disorders. *J Psychiatry Neurosci.* 2011;36(3):195-203.

Tseng PT, Chen YW, Tu KY, Wang HY, Chung W, Wu CK, Hsu SP, Kuo HC, Lin PY. State-dependent increase in the levels of neurotrophin-3 and neurotrophin-4/5 in patients with bipolar disorder: a meta-analysis. *J. Psychiatr. Res.* 2016; 79(3): 86-92

Tunca Z, Ozerdem A, Ceylan D, Yalçın Y, Can G, Resmi H, Akan P, Ergör G, Aydemir O, Cengiz C, Kerim D. Alterations in BDNF (brain derived neurotrophic factor) and GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) serum levels in bipolar disorder: The role of lithium. *J Affect Disord.* 2014;166:193-200.

Tunca Z, Kıvrıcık Akdede B, Özerdem A, Alkın T, Polat S, Ceylan D, Bayın M, Cengizçetin Kocuk N, Şimşek S, Resmi H, Akan P. Diverse glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) support between mania and schizophrenia: a comparative study in four major psychiatric disorders. *Eur Psychiatry.* 2015; 30(2):198-204.

Valvassori SS, et al. Animal models of mood disorders: focus on bipolar disorder and depression. In: Conn PM, animal models for the study of human disease. Academic Press, London, 2017a;991-1002.

Valvassori SS, Resende WR, Dal-Pont G, Sangaletti-Pereira H, Gava FF, Peterle BR, Carvalho AF, Varela RB, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Lithium ameliorates sleep deprivation-induced mania-like behavior, hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis alterations, oxidative stress and elevations of cytokine concentrations in the brain and serum of mice. *Bipolar Disord.* 2017b;19(4):246-258.

Valvassori SS, Mariot E, Varela RB, Bavaresco DV, Dal-Pont GC, Ferreira CL, Andersen ML, Tye SJ, Quevedo J. The role of neurotrophic factors in manic-, anxious- and depressive-like behaviors induced by amphetamine sensitization: Implications to the animal model of bipolar disorder. *J Affect Disord.* 2019; 245:1106-1113.

Walz JC, Frey BN, Andreazza AC, Ceresér KM, Cacilhas AA, Valvassori SS, Quevedo J, Kapczinski F. Effects of lithium and valproate on serum and hippocampal neurotrophin-3 levels in an animal model of mania. *J Psychiatr Res.* 2008; 42(5):416-21.

ANEXOS

ANEXO I



**Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais**

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Avaliação Dos Efeitos Do Butirato De Sódio Sobre Os Níveis De Citocinas Em Modelos Animais De Mania Induzidos Por Anfetamina E Privação Do Sono Paradoxal”, Protocolo nº 007/2016-1 sob a responsabilidade de Samira da Silva Valvassori, equipe: Roger B. Varela, Wilson R. Resende, Daniela V. Bavaresco, Gustavo C. Dal-Pont, Edemilson Mariot, Camila Leite Ferreira, Jéssica Lopes-Borges, Bruna Peterle, Gabriela Barbosa Nadas, Guilherme Bianchini, Fernanda Frederico Gava, Mikaela Miranda, Paula Tonin, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei no. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto no. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da UNESC – Universidade do Extremo Sul Catarinense.

Vigência do Projeto	01/03/2016 a 01/03/2018
Espécie/Linhagem	Camundongo heterogênico Black C57Bl/6 Rato heterogênico Wistar
Nº. De animais	160
Peso/Idade	20-30g / 60 dias 250-300g / 60 dias
Sexo	M
Origem	Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the following Project:

Protocol number: 007/2016-1


Principal Investigator: Samira da Silva Valvassori

Researchers: Roger B. Varela, Wilson R. Resende, Daniela V. Bavaresco, Gustavo C. Dal-Pont, Edemilson Mariot, Camila Leite Ferreira, Jéssica Lopes-Borges, Bruna Peterle, Gabriela Barbosa Nadas, Guilherme Bianchini, Fernanda Frederico Gava, Mikaela Miranda, Paula Tonin.

Project title: “Assessment Of The Effects Of Sodium Butyrate On Levels Of Cytokines In Animal Models Of Mania Induced By Amphetamine And Sleep Deprivation Paradoxical”.

The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on www.unesc.net/propex/ceua or by e-mail: ceua@unesc.net.

Criciúma, 23 de fevereiro de 2016.


JAIRO JOSÉ ZOCHE
 Coordenador da CEUA