



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação Farmácia-Bioquímica

INGRID QUEIROZ DA SILVA

**Papel do complexo receptor glutamato/NMDA e óxido nítrico no córtex
pré-frontal medial na ansiedade de camundongos expostos ao labirinto em
cruz elevado**

Araraquara, SP

2021

INGRID QUEIROZ DA SILVA

**Papel do complexo receptor glutamato/NMDA e óxido nítrico no córtex
pré-frontal medial na ansiedade de camundongos expostos ao labirinto em
cruz elevado**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Farmacêutico(a) Bioquímico(a).

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza

Coorientador: Dr. Diego Cardozo Mascarenhas e Ms. Nathália Santos Costa

Araraquara, SP

2021

S586p

Silva, Ingrid Queiroz da.

Papel do complexo receptor glutamato/NMDA e óxido nítrico no córtex pré-frontal medial na ansiedade de camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado / Ingrid Queiroz da Silva. – Araraquara: [S.n.], 2021.

56 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação – Farmácia Bioquímica) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Ricardo Luiz Nunes de Souza.

Coorientador: Diego Cardozo Mascarenhas.

Coorientador: Nathália Santos Costa.

1. Ansiedade. 2. Estresse. 3. Córtex pré-frontal medial. 4. Derrota Social. 5. Óxido nítrico. I. Souza, Ricardo Luiz Nunes de, orient. II. Mascarenhas, Diego Cardozo, coorient. III. Costa, Nathália Santos, coorient. IV. Título.

*Conheça todas as teorias, domine
todas as técnicas, mas ao tocar uma alma
humana, seja apenas outra alma humana.*

Carl Jung

Agradecimentos

Agradeço à minha **família** pelo apoio e por possibilitar a realização do meu sonho.

A FCFAr por me proporcionar tantas oportunidades e aprendizados ao longo da graduação.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Ricardo** que me deu a oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa e me confiou esse projeto.

Ao meu coorientador, **Diego Mascarenhas** que me ajudou com tudo e em todos os momentos que eu precisei desde que eu comecei minhas atividades no laboratório.

A todos os alunos do laboratório de farmacologia, que sempre se dispuseram a me ajudar e tirar dúvidas sempre que precisei.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro, que foi muito importante para o desenvolvimento deste projeto.

Aos meus **amigos**, que independente da distância estiveram presentes, me fornecendo apoio nos momentos mais difíceis e me ajudando a enfrentar os desafios.

RESUMO

Medo e ansiedade são emoções decorrentes da resposta animal frente a estímulos ameaçadores ou perigosos, que resultam na exibição de reações de defesa. O estresse é um fator de risco para o desenvolvimento de diversos transtornos mentais, uma vez que não necessariamente todos os indivíduos expostos a um estressor desenvolvem as mesmas alterações comportamentais e fisiológicas. Desta forma, o Córtex Pré-Frontal medial (CPFm), um importante substrato neural que modula simultaneamente o estresse e a ansiedade, parece possuir lateralização funcional na execução das reações de defesa. Neste sentido, a estimulação do CPFm Direito (D) induz respostas ansiogênicas, enquanto o CPFm Esquerdo (E), quando ativado, as atenua. Além disso o óxido nítrico, sintetizado pela ativação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, e o próprio NMDA (N-metil-D-aspartato – agonista glutamatérgico), parecem modular as reações de defesa induzidas ou não pelo estresse. A derrota social de um intruso por um coespecífico parece ser uma interessante ferramenta para explorar o efeito do estresse no contexto do CPFm. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar o papel do receptor glutamatérgico NMDA e dos neurotransmissores óxido nítrico e glutamato no córtex pré-frontal no comportamento defensivo de camundongos derrotados socialmente e/ ou expostos ao Labirinto em Cruz Elevado (LCE). Para isso, foi realizada (1) a avaliação dos efeitos da injeção de NMDA, em concentração sem efeito intrínseco na ansiedade (estabelecida por estudo piloto), no CPFm Esquerdo, em camundongos socialmente derrotados e expostos ao LCE; (2) avaliação dos efeitos da inibição da óxido nítrico sintase neuronal (NOSn), via injeção de intra-CPFm Direito de NPLA, no comportamento defensivo de camundongos expostos ao LCE. Os resultados demonstram que o protocolo usado para a exposição aguda ao estresse de derrota

social não promoveu efeito ansiogênico. Além disso, a injeção de NPLA no CPFmD revelou um efeito ansiolítico em camundongos expostos ao LCE. Desta forma, esses resultados sugerem um envolvimento nitrérgico no CPFmD na modulação da ansiedade em camundongos expostos ao LCE.

Palavras-chave: Ansiedade; Estresse; Córtex pré-frontal medial; Derrota Social, Óxido nítrico.

ABSTRACT

Fear and anxiety are emotions arising from animal's response to threatening or dangerous stimuli which results in the display of defensive reactions. The stress is a risk factor for the development of various mental disorders, considering that not all individuals exposed to a stressor develop the same behavioral and physiological outcomes. Therefore, the medial prefrontal cortex, an important neural substrate that modulate stress and anxiety simultaneously seems to have functional lateralization in the execution of defensive reactions. Consequently, the stimulation of right (R) mPFC induces anxiogenic-like responses, in contrast to the left (L) mPFC that, when activated, reduce this anxiolytic effect. In addition, the nitric oxide that is synthesized by the activation of NMDA-type glutamatergic receptors, and the NMDA (N-metil-D-aspartate – glutamatergic agonist) itself, seems to modulate the defensive reactions induced or not by the stress. The social defeat of an intruder by a conspecific seems to be an interesting tool to explore the effect of stress in the mPFC context. Therefore, the aim of this study was to investigate the role of the NMDA glutamatergic receptor and the neurotransmitters nitric oxide and glutamate in the prefrontal cortex in the defensive behavior of mice socially defeated and/or exposed to the elevated plus maze (EPM). Accordingly, it has been performed (1) the evaluation of the effects of NMDA injection, at an intrinsic-inactive dose in anxiety, in the Left mPFC, in mice socially defeated and exposed to EPM; (2) evaluation of the effects of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) inhibition, through intra-RmPFC NPLA injections on the defensive behavior of mice exposed to EPM. The results demonstrate that the protocol used for acute exposure to social defeat stress did not promote anxiogenic-like effect. Furthermore, NPLA injection into the RmPFC showed an anxiolytic role in mice

exposed to EPM. Thus, these results suggest a nitroergic involvement in right mPFC in the modulation of anxiety in mice exposed to EPM.

Key-words: Anxiety; Stress; Medial Prefrontal Cortex; Social defeat; Nitric oxide.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1 Ansiedade e medo.....	9
1.2 Ansiedade patológica	11
1.3 Fármacos usados na ansiedade.....	12
1.4 Neuroquímica da ansiedade	16
1.5 Estresse	18
1.6 Labirinto em Cruz Elevado (LCE.....	22
1.7 Substratos neurais da ansiedade	24
2. OBJETIVO.....	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Sujeitos.....	28
3.2 Cirurgia e administração de drogas intra-CPFm.....	28
3.3 Drogas	29
3.4 Derrota social	29
3.5 Histologia.....	30
3.6 Delineamento experimental	30
3.6.1 Experimento 1: Efeito da microinjeção de NMDA no CPFm Esquerdo no comportamento defensivo de camundongos socialmente derrotados expostos ao LCE.	30
3.6.2 Experimento 2: Efeito da microinjeção de NPLA no CPFm Direito no comportamento defensivo de camundongos expostos ao LCE.	31
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
4. RESULTADOS	33
4.1 Injeções no CPFm	33
4.2 Experimentos	34
4.2.1 Experimento 1: Ausência de efeitos da microinjeção de NMDA no CPFm Esquerdo no comportamento defensivo de camundongos socialmente derrotados expostos ao LCE.....	34
4.2.2 Experimento 2: Efeito ansiolítico da microinjeção de NPLA no CPFm Direito no comportamento defensivo de camundongos expostos ao LCE.	36
5. DISCUSSÃO	38
6. CONCLUSÃO	42
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1. INTRODUÇÃO

1.1 Ansiedade e medo

A busca pelo valor adaptativo dos processos comportamentais e psicológicos teve seu início com a obra de Charles Darwin "*The expression of emotion in man and in animals*", que através da investigação do comportamento de outros animais, objetivou compreender a neurobiologia das emoções humanas, entre elas o medo e a ansiedade. Sendo essa comparação possível devido à paridade das características compartilhadas com outros animais ancestrais. (BRANDÃO et. al., 2003; GRAEFF, 1996)

Apesar de serem estados emocionais correlacionados, o medo e a ansiedade podem ser distinguidos com base nos estímulos e/ou situações que os desencadeiam, de modo que o medo é a resposta emocional à ameaça iminente real ou percebida, enquanto ansiedade é a antecipação de ameaça futura, um perigo em potencial. (GRAEFF, 1996; AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013)

Assim sendo, a ansiedade pode ser qualificada como uma emoção subjetivamente não prazerosa e desagradável acompanhada por sentimentos de apreensão, que surge a partir das reações de defesa dos animais em resposta a situações que podem comprometer o seu bem-estar, integridade física ou sobrevivência. Dado o seu valor adaptativo, é associada a respostas comportamentais e neurovegetativas que influenciam a eficiência de execução de tarefas e, portanto, podem ser empregadas como medidas objetivas de ansiedade. (NUTT, 1990; GRAEFF, 2012)

Essas reações são moduladas por regiões que constituem o sistema encefálico de defesa, que elabora e exhibe comportamentos de fuga e/ou luta, esquiva ativa e inibitória, congelamento, avaliação de risco, antinocicepção e ativação autonômica (ex. taquicardia, vasoconstrição, aumento da pressão arterial), acompanhadas da liberação de hormônios e neurotransmissores que preparam o organismo para responder a tal ameaça. (BLANCHARD et al., 1993; BLANCHARD, 2003)

Embora tais alterações sejam importantes diante de um contexto ou situação aversivos, tornam-se mal adaptadas em condições que não oferecem perigo nem hostilidade ao indivíduo. (GRAY; MCNAUGHTON, 2000; BLANCHARD et. al. 2001, MCNAUGHTON; CORR, 2004)

Dependendo da intensidade que a ansiedade se manifesta, pode influenciar de forma díspar o desempenho em tarefas cognitivas. Desta forma, contrapondo o aumento no desempenho inicial numa baixa intensidade, níveis muito elevados de ansiedade acarretam prejuízos, figurando a ansiedade patológica, um conjunto de transtornos psiquiátricos que necessitam de tratamento psicológico e/ou farmacológico. A Figura 1 representa esse conceito. (GRAEFF, 2012)

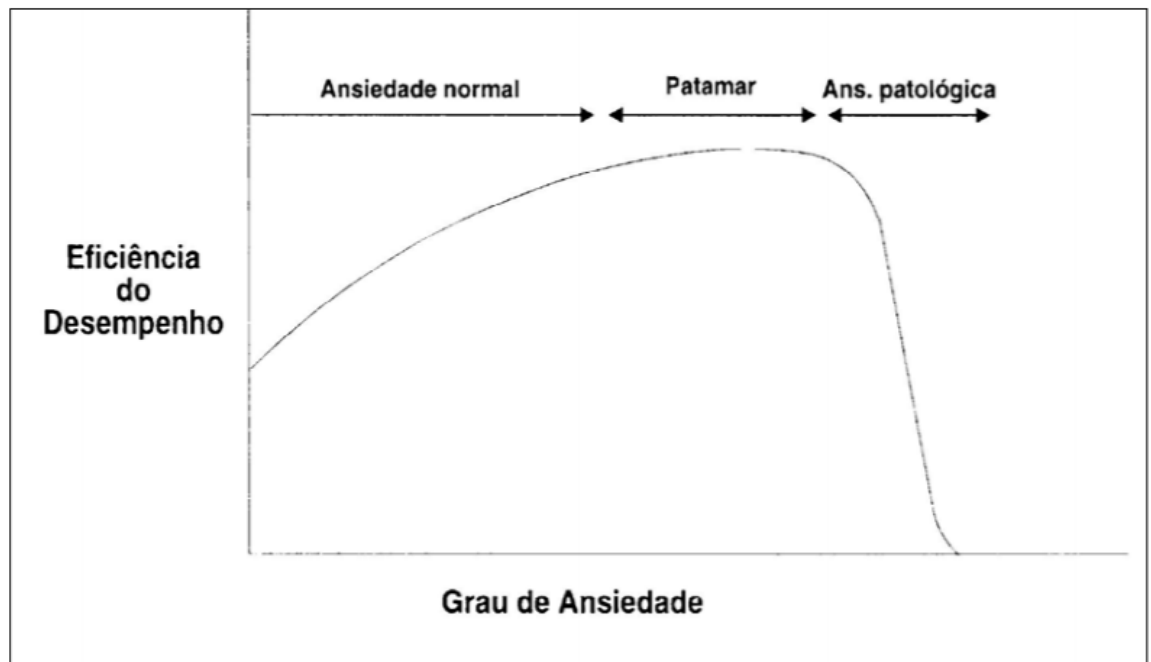


Figura 1. Retirada de Graeff et al. 1999 - Relação entre grau de ansiedade e desempenho.

1.2 Ansiedade patológica

Apesar da sua importância biológica, a ansiedade perde sua função adaptativa e torna-se patológica no momento que o conflito induzido por essa emoção configura-se como desproporcional e, portanto, traz prejuízo à pessoa. Estes prejuízos acarretam déficits em situações importantes da vida do indivíduo no âmbito acadêmico, social e profissional. (LENHARDTK, 2017)

De acordo com a OMS (Organização Mundial da Saúde), a prevalência mundial de transtornos de ansiedade é de 3,6%, sendo o Brasil o país com maior número de casos no mundo, atingindo cerca de 9% da sua população. (OMS, 2017)

A ansiedade patológica pode ser classificada em diferentes transtornos, de acordo com o tipo de objeto ou situação que desencadeia o conflito, de modo a facilitar

o diagnóstico e escolha de terapias. (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013)

Um sistema de classificação das doenças mentais, bem definido e amplamente aceito, se torna fundamental para o diagnóstico clínico e investigação científica dos distúrbios de ansiedade. Neste sentido, surge o Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM) da *American Psychiatric Association*. Em conformidade com a sua quinta edição (DSM-5, 2013), categorizam-se tais transtornos em: transtorno de ansiedade de separação, mutismo seletivo, fobias específicas, transtorno de ansiedade social, transtorno do pânico, agorafobia, transtorno de ansiedade generalizada, transtorno de ansiedade devido a uma condição médica geral, outros transtornos de ansiedade especificados e o transtorno de ansiedade não especificado. (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013)

Para que o paciente possa ser classificado como portador de algum destes transtornos mentais, é necessário que os sintomas apresentados por ele cumpram os critérios de diagnósticos definidos nos manuais de Psiquiatria. Atualmente, a maioria das pessoas pode ser tratada através de uma intervenção profissional adequada, com tratamento farmacológico combinado com psicoterapia. (LENHARDTK, 2017)

1.3 Fármacos usados na ansiedade

Diferentes substâncias têm sido estudadas visando a compreender a neuroquímica da ansiedade. Entre elas as aminas biogênicas, como a noradrenalina, a dopamina e a serotonina; aminoácidos, como o ácido gama-aminobutírico (GABA), a glicina e o glutamato; peptídeos, como o fator de liberação de corticotropina (CRF), o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e a colecistocinina (CCK); e esteróides, como

a corticosterona (em animais) e o cortisol (em humanos), constituem o repertório neuroquímico explorado no manejo da ansiedade. (MARGIS, 2003)

Diversos neurotransmissores estão envolvidos na mediação da ansiedade e de seus transtornos. Aqueles cujo papel e ação farmacológica encontram-se bem fundamentados e, portanto, serão abordados, são o aminoácido inibitório GABA (ácido gama-aminobutírico), a serotonina, também denominada 5-hidroxitriptamina (5HT) e a noradrenalina (NA). (GRAEFF, 1996; GRAEFF 2012)

O gaba é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central, sendo responsável pela inibição sináptica quando se liga ao receptor $GABA_A$, causando sedação, hipnose, ansiólise, relaxamento muscular, entre outros efeitos. Os benzodiazepínicos modulam a transmissão GABAérgica, aumentando alostericamente a afinidade do receptor pelo neurotransmissor endógeno GABA e por consequência a atividade deste canal inibitório. (GRAEFF, 1996; GRAEFF 2012)

Os receptores $GABA_A$, também denominados de receptores benzodiazepínicos (BZD), e o GABA estão presentes em toda parte no SNC, afetando diversos sistemas funcionais. As subunidades que constituem o receptor $GABA_A$ são de vários subtipos, sendo seis diferentes subunidades α , três subunidades β , e três subunidades γ . Apesar das inúmeras combinações possíveis de receptores $GABA_A$, alguns são mais comumente expressos no SNC, e parecem estar ligados as diferentes ações terapêuticas dos BZDs. Neste sentido, os receptores que expressam a subunidade $\alpha 1$ medeiam efeitos anticonvulsivantes, hipnóticos e sedativos, além de estarem associados à dependência ao uso de seus ligantes. Já os receptores que expressam a subunidade $\alpha 2$ parecem mediar os efeitos ansiolíticos, enquanto os que expressam $\alpha 2$, $\alpha 3$ e $\alpha 5$, medeiam o relaxamento muscular. Finalmente, a amnésia anterógrada

(esquecimento de eventos ocorridos durante a ação do medicamento) atrelada ao uso de BZDs parece ocorrer via ativação de receptores que expressam a subunidade $\alpha 1$ e $\alpha 5$. Devido aos efeitos colaterais e adversos do uso prolongado dos BZDs, tem-se estudado abordagens de modificação molecular no intuito de desenvolver fármacos seletivos para a subunidade $\alpha 2$, a fim de evitar sedação e o potencial para dependência, porém ainda sem muito sucesso.

O interesse pela participação da serotonina (5-HT) na ansiedade vem se intensificando com a descoberta de ansiolíticos não-benzodiazepínicos que parecem atuar primariamente sobre a neurotransmissão serotoninérgica e não possuem os mesmos efeitos indesejados que eles como sedação, disfunção cognitiva, depressão respiratória, alterações psicomotoras (fala disártrica, marcha atáxica), depressão e principalmente dependência química. (GRAEFF, 1996; GRAEFF 2012; DIRETRIZES CLÍNICAS COMHUPES, 2013)

A neurotransmissão serotoninérgica é bastante complexa devido, tanto à existência de diversas vias serotoninérgicas no sistema nervoso central, quanto de receptores de 5-HT, que são subdivididos em vários tipos e subtipos, com localização celular característica. A 5-HT exerce um duplo papel na regulação da ansiedade, podendo ter efeito ansiogênico ou ansiolítico, dependendo da região encefálica em que atua. Assim, a serotonina desempenha papel ansiogênico na amígdala, ao passo que provoca efeitos panicolíticos na matéria cinzenta periaquedutal (MCP). De acordo com estudos de Graeff (2003), isso ocorre, pois enquanto a serotonina facilita a defesa potencial ou distal na amígdala, inibe a defesa proximal na MCP. Ou seja, pode-se dizer que o aumento de 5-HT na amígdala facilita a esquia, enquanto a sua diminuição prejudica. Além disso, o aumento ou diminuição da 5-HT na MCP resulta

na inibição e facilitação da fuga, respectivamente. (GRAEFF, 1996; GRAEFF, 2003; GRAEFF, 2012; MARGIS, 2003).

As azapironas são agonistas parciais de auto receptores somatodendríticos 5-HT_{1A}, que são inibitórios e expressos nos corpos celulares de neurônios serotoninérgicos localizados nos núcleos da rafe. Após complexos mecanismos de dessensibilização pré-sinápticos nos núcleos da rafe, e pós-sinápticos nos receptores 5-HT₂ da amígdala, o uso da buspirona desencadeia efeito anticonflito após algumas semanas do início do tratamento. (GRAEFF, 1996; GRAEFF, 2012; ANDREATTI, 2001)

A noradrenalina também participa centralmente da modulação da ansiedade, todavia o papel da serotonina possui mais protagonismo no sistema nervoso central. Neste sentido, a noradrenalina é liberada em nível periférico, através de sistema nervoso autônomo simpático, em resposta a situações estressantes ou em crises ansiosas, promovendo manifestações neurovegetativas características da ansiedade, dentre elas taquicardia, aumento da pressão arterial e tremores musculares. Desta forma, utiliza-se os beta-bloqueadores que agem atenuando esses sintomas pelo bloqueio de receptores beta-adrenérgicos periféricos. (ANDREATTI et. al., 2001; BRAGA et. al. 2010)

Apesar de existirem diversos tratamentos para a ansiedade, novos estudos acerca dos circuitos neurais que modulam a ansiedade se tornam indispensáveis para o desenvolvimento de estratégias farmacológicas destituídas dos principais inconvenientes das terapias presentes, tendo maior especificidade de ação e conseqüentemente menos efeitos adversos, tendo em vista uma melhora no quadro clínico e na qualidade de vida do paciente.

1.4 Neuroquímica da ansiedade

Desde a década de 1980, já havia investigações a respeito dos efeitos dos aminoácidos excitatórios nos comportamentos defensivos, visando compreender a neurobiologia da ansiedade. Estudos sugeriram que aminoácidos excitatórios têm um papel fisiológico para a transmissão química central na mediação das respostas defensivas de ratos. (CAROBREZ, 2003)

O glutamato é o principal aminoácido excitatório e ubíquo no sistema nervoso central. Os seus receptores podem ser classificados como ionotrópicos (também denominados de canais iônicos) e metabotrópicos (ligados a mecanismos intracelulares de transdução de sinal, via proteína G). Os receptores ionotrópicos são classificados de acordo com o agonista mais seletivo e subdivididos em: NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA (A-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato) e cainato. (CAROBREZ, 2003)

Tais receptores são amplamente distribuídos no SNC e diversos estudos demonstram a presença e participação de receptores do tipo NMDA em estruturas relacionadas com respostas de medo e ansiedade como a MCP e o córtex pré-frontal medial (CPFm) (MIGUEL; NUNES-DE-SOUZA, 2008; RESSTEL, 2008). Neste sentido, diversos estudos demonstram que o bloqueio destes receptores no CPFm e em outras estruturas relacionadas com as reações de defesa promove um efeito ansiolítico (RESSTEL et al., 2008; AGUIAR; GUIMARAES, 2011; LISBOA, et al., 2011; FARIA, et al., 2016).

Existem evidências sugestivas de que a ação pró-aversiva dos aminoácidos excitatórios está relacionada à ativação da síntese de óxido nítrico, possivelmente

induzida quando receptores glutamatérgicos, principalmente NMDA são ativados. (GARTHWAITE et. al. 1988).

O óxido nítrico (NO) é um gás inorgânico incolor e bastante reativo devido ao elétron desemparelhado em sua órbita externa (GUIX et al., 2005). É considerado um neurotransmissor atípico por suas características físico-químicas particulares e se encontra de forma abundante no organismo (GALLY et al., 1990). Sendo altamente difusível, atravessa membranas biológicas facilmente e não é armazenado em vesículas, sendo produzido quando necessário e rapidamente degradado, devido a sua meia-vida curta de poucos segundos.

Em nível de sinapse neuronal, a produção de NO é iniciada quando um neurônio pré-sináptico libera o glutamato, que se difunde pelo espaço sináptico e se liga ao receptor NMDA em um neurônio pós-sináptico. Enquanto persistir essa união (glutamato/receptor NMDA) mantem-se a abertura de canais excitatórios no neurônio receptor, propiciando o influxo de Ca^{2+} na célula e a sua posterior ligação com a calmodulina. O complexo Ca^{2+} /calmodulina liga-se então à forma da NO sintase (NOSn) encontrada nas células nervosas, e esta ligação ativa a enzima que catalisa a oxidação da L-arginina para L-citrulina e NO. O NO recém-sintetizado pode então deixar o neurônio por difusão direta pela membrana da célula e desempenhar papel como mensageiro retrógrado, difundindo-se do neurônio pós-sináptico e retornando para o neurônio pré-sináptico onde ativa a enzima guanilato ciclase solúvel. A guanilato ciclase catalisa a reação que produz guanosina monofosfato ciclase (GMPc). O GMPc, por sua vez, desencadeia o processo que resulta na liberação do glutamato e o ciclo se repete (Figuras 2 e 3). (QUEIROZ, 1999)

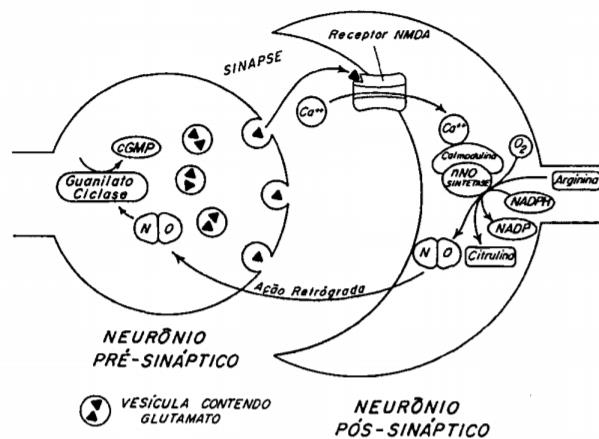


Figura 2. Retirado de Queiroz, 1999 - Produção do óxido nítrico a partir da ativação da enzima NO sintase neuronal (NOSn) e seu mecanismo de atuação como mensageiro retrógrado.

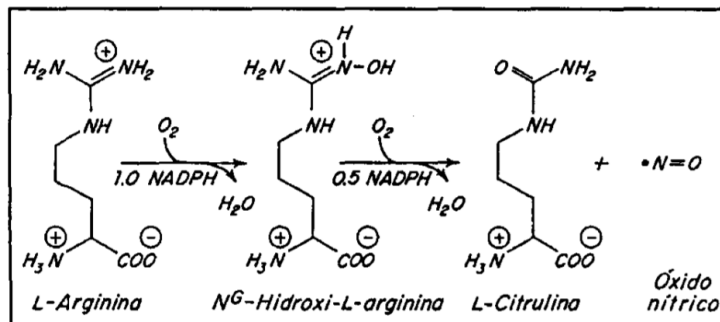


Figura 3. Retirado de Queiroz, 1999 - Representação esquemática da biossíntese de óxido nítrico, a partir da L-arginina, catalisada pela enzima NO sintase.

Apesar de existirem diversos estudos que relacionem comportamentos defensivos com o medo e a ansiedade, ainda há lacunas para compreensão da função e da importância das vias neurais e neurotransmissores envolvidos na modulação dessas respostas, bem como para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas para o tratamento ou prevenção dos distúrbios relacionados. (COSTA et. al., 2016)

1.5 Estresse

De acordo com Selye (1959), o estresse é um elemento inerente a toda doença, que produz certas modificações na estrutura e na composição química do corpo, as quais podem ser observadas e mensuradas.

A resposta a uma situação estressora compreende aspectos cognitivos, comportamentais e fisiológicos, sendo resultado da interação entre a percepção do indivíduo quanto à sua capacidade de resposta e às demandas do meio, objetivando proporcionar uma melhor percepção da situação com um processamento mais rápido da informação disponível, para então selecionar condutas adequadas e preparar o organismo para agir de maneira rápida e vigorosa. A sobreposição destes três níveis é eficaz até certo limite, o qual uma vez ultrapassado pode desencadear um efeito desorganizador. (MARGIS, 2003; VANLTALLIE, 2002)

O estresse é um fator de risco para o desenvolvimento de diversos dos transtornos mentais citados anteriormente. Para compreender como o estresse pode desencadear doenças, se faz necessário a investigação dos mecanismos empregados pelo organismo para adaptar-se aos estressores e considerar maneiras pelas quais essas adaptações inicialmente protetoras se tornam prejudiciais à saúde. (MARGIS, 2003)

Podemos levar em conta que dificuldades para ajustar as respostas emocionais ao cotidiano ocasionam sintomas físicos, como tensão muscular, sudorese e palpitações e também um desequilíbrio psicológico nos indivíduos, que acarreta em um aumento significativo no número de pessoas portadoras de algum problema mental, como os distúrbios de ansiedade. (LENHARDTK, 2017)

O impacto causado por um agente estressor é determinado em parte por características do próprio estímulo, e em parte pela habilidade que o organismo possui em lidar com a situação. Não necessariamente todos os organismos expostos ao estresse desenvolvem as mesmas alterações comportamentais e moleculares. (CAMILO, 2011; GALVÃO-COELHO, 2015; KORTE et. al. 2005)

Por muito tempo, a alocação dos animais para experimentação ocorreu em dois grupos, denominados “controle” e “experimental”, onde qualquer mudança ao nível molecular, comportamental e fisiológico no grupo “estressado” era atribuída aos efeitos do estresse. Porém, após a exposição a esse estresse, alguns animais exibiam alterações no comportamento social, enquanto outros não. Desta forma, foi proposta a divisão dos indivíduos que passaram pelo estresse em dois grupos: susceptíveis e resilientes. (CARRILLO, 2017; KRISHNAN, 2007; KRISHNAN, 2014)

Em um sentido geral, resiliência significa “capacidade que tem um corpo de ter flexibilidade”, ou seja, ao receber a ação de um fator externo (um estressor) e sofrer alterações, consegue voltar ao seu estado normal depois de cessado o estímulo. Inserindo no contexto da psicologia, resiliência seria “o processo adequado de adaptação em face de adversidades, traumas, tragédias, ameaças ou motivos significativos de estresse”. (CAMILO, 2011; GALVÃO-COELHO, 2015; CÉLIA, 1997)

A resiliência pode ser considerada como um processo dinâmico, que possui variações individuais, onde alguns indivíduos podem desenvolver problemas e outros podem superar as adversidades. Os indivíduos resilientes utilizam estratégias para desenvolver comportamentos adaptativos em situações de estresse, que o ajudam a lidar com o evento estressor, a enfrentar a situação problema e contribuem para que consequências favoráveis ocorram, sugerindo um papel importante da experiência na expressão da resiliência (CAMILO, 2011; GALVÃO-COELHO, 2015; CONNOR; DAVIDSON, 2003; GARMEZY, 1996).

Existem diversas estratégias que vêm possibilitando a pesquisa sobre as alterações psicofisiológicas induzidas pelo estresse. Dentre elas, surge o estresse de derrota social. A derrota social consiste em um conflito entre coespecíficos, no qual

um animal dominante residente agressor (sujeito que exhibe comportamentos espontâneos de agressão aos demais da gaiola) ataca um intruso que exhibe comportamentos defensivos. Quando o animal residente ataca um intruso, desencadeia uma série de alterações comportamentais, endócrinas e fisiológicas no animal agredido, o que permite sua utilização para o estudo de desordens relacionadas ao estresse (ex.: depressão, ansiedade e abuso de drogas) (BJÖRKQVIST, 2001; KEENEY; HOGG, 1999; LAVIOLA et al., 1999; STEIN; BOUWER, 1997; VALZELLI, 1981).

Dentre os comportamentos defensivos, se destaca a postura de submissão, que é caracterizada, em camundongos, pela elevação do corpo sobre as patas traseiras, patas dianteiras estendidas em direção ao agressor, cabeça retraída e orelhas arqueadas (Figura 4). (MICZEK et al. 1982)

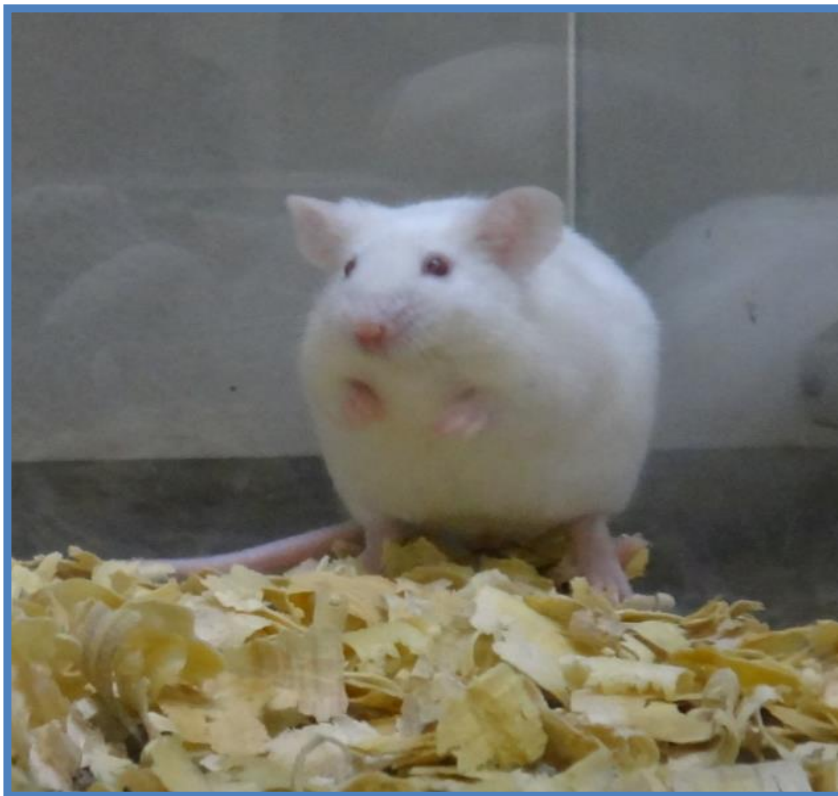


Figura 4. Camundongo em postura característica de derrota.

Vários estudos têm enfatizado os efeitos de estressores no funcionamento encefálico, indicando assim que algumas estruturas são particularmente afetadas pelo estresse agudo e crônico (e.g., GEE; CASEY, 2015). Nesse contexto, o Córtex Pré-Frontal medial (CPFm) está intimamente relacionado com a modulação de respostas emocionais ao estresse (VERMETTEN; BREMNER, 2002; GOLD et al., 2015; MAREN; HOLMES, 2016).

1.6 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O Labirinto em Cruz Elevado (LCE) é um dos principais modelos de estudo para a ansiedade. É derivado do experimento de Montgomery (1955), o qual levantou a hipótese que a exposição a um local aberto evocava conflito de aproximação-evitação em ratos, sendo evidenciado comportamentalmente pela exploração e esquia. Observou-se menor exploração do braço aberto em relação aos fechados, mostrando que locais abertos levam o animal à esquivarem-se deste compartimento e, portanto, à preferência pelos locais fechados. Mais tarde, o modelo foi modificado e validado comportamental, fisiológica e farmacologicamente para ratos e camundongos. (HANDLEY; MITHANI, 1984; LISTER, 1987; PELLOW et al., 1985)

Considerado um método útil para medir ansiedade, constatou-se que drogas ansiolíticas seletivamente aumentam a exploração dos braços abertos, sem um equivalente aumento na exploração dos braços fechados, e agentes ansiogênicos ao contrário, diminuem a exploração dos braços abertos. (MORATO, 2006; PELLOW, 1985)

O LCE é um aparato de madeira composto por dois braços fechados por paredes de vidro (30 x 5 x 15 cm) e dois abertos (30 x 5 x 0,25 cm) conectados a uma plataforma central (5 x 5 cm) com elevação de 38,5 cm do solo (Figura 5).



Figura 5. Representação do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) para camundongos.

O teste consiste em posicionar o animal na plataforma central defronte a um dos braços abertos, deixando-o explorar livremente todo o aparato por 5 minutos, para o registro das medidas espaço-temporais relacionadas à ansiedade (e.g. frequência de entrada e tempo gasto nos braços abertos, em porcentagem) e locomoção (frequência absoluta de entradas nos braços fechados). Os comportamentos foram registrados por um sistema de câmera e cartão de memória e a análise desses vídeos realizada através do software “X-Plo-Rat 2005”, desenvolvido pelo grupo de pesquisa do Professor Doutor Silvio Morato, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP, Brasil.

1.7 Substratos neurais da ansiedade

O medo e a ansiedade são emoções moduladas por várias estruturas encefálicas, estando mais relacionadas à ansiedade as estruturas rostrais (por exemplo, córtex pré-frontal, sistema septohipocampal e amígdala) e ao medo, as caudais (por exemplo, MCP e o hipotálamo medial), porém com importante sobreposição de substratos para ambas emoções. (CARVALHO-NETTO, 2009)

O sistema encefálico de defesa, composto entre outras estruturas pela amígdala, hipotálamo e matéria cinzenta periaquedutal (MCP), medeia reações de fuga e luta, ativação autonômica e antinocicepção, participando diretamente da modulação de reações características de ansiedade e medo. (BANDLER; DEPAULIS, 1991; FANSELOW, 1991; GRAEFF, 1993; BEHBEHANI, 1995; CARRIVE et. al., 1997; LANG et. al., 1998; LOVICK, 2000; BRANDÃO, 2003; WALKER; CARRIVE, 2003). O CPF exibe densas conexões recíprocas com essas estruturas (e.g. EUSTON; GRUBER; MCNAUGHTON, 2012), o que promove sua habilidade de modular estados emocionais como medo e ansiedade (COURTIN et al., 2013; GOLD; MOREY; MCCARTHY, 2015).

O CPFm é uma estrutura prosencefálica e límbica, que pode ser dividida em cingulados (Cg) 1 e 2, pré-límbico (PrL) e infra-límbico (IL) (PAXINOS; FRANKLIN, 2001). Funcionalmente, está envolvido com memória (EUSTON et al., 2012), tomada de decisão (BECHARA; DAMASIO, 2002), flexibilidade cognitiva (GRUBER et al., 2010), cognição executiva (YUAN; RAZ, 2014), interação social e processamento emocional (DAMASIO, 2000).

Alguns estudos mostram que lesões no CPFm de ratos levam à diminuição dos níveis de ansiedade, uma vez que há aumento do tempo e da frequência de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, um importante modelo animal de ansiedade (GONZALEZ et al., 2000; LACROIX et al., 2000; SHAH et al., 2003), além de aumentar a interação social em ratos (GONZALEZ et al., 2000; TREITE, 2003).

“Nossa ansiedade cotidiana raramente é causada por estímulos inatos de medo ou mesmo estímulos físicos que sinalizam perigo, mas sim por símbolos, cujo sentido é codificado culturalmente e processado de maneira cognitiva. Desta forma, a função anormal do CPFm está relacionada a vários distúrbios neuropsiquiátricos”. (RESSTEL et al., 2008)

Resultados recentes do nosso laboratório sugerem que o Córtex Pré-Frontal medial possui lateralização funcional na modulação das reações de defesa (COSTA et al., 2016), uma vez que a ativação nitrérgica através de injeção unilateral de NOC-9 (doador de óxido nítrico) intra-CPFm Direito promove efeito ansiogênico, o que não é observado quando do tratamento intra-CPFm Esquerdo (CPFmE) ou bilateral, sugerindo que a ativação do hemisfério Esquerdo reverte o efeito ansiogênico promovido pelo CPFm direito.

Além disso, o CPFmE parece ter um importante papel na modulação de respostas de ansiedade relacionadas ao estresse de derrota social, uma vez que a inibição sináptica dessa estrutura no momento do evento estressor (i.e., derrota social) culmina em efeito ansiogênico observado no labirinto em cruz elevado (LCE) 24h após o estresse, o que não é observado em animais que passam pelo estresse com CPFmE ativo (i.e., sem inibição). Neste mesmo trabalho, Costa e colaboradores (2016) demonstraram que a exposição aguda à derrota social desencadeia efeito ansiogênico em animais expostos ao LCE imediatamente após o estresse.

Portanto, os hemisférios do CPFm parecem ter importantes, mas diferentes papéis na modulação de respostas de ansiedade relacionadas ou não ao estresse de derrota social. Essas respostas variam de acordo com a administração de drogas que levam a ativação ou inibição momentânea de cada um dos hemisférios, como foi mostrado nos experimentos citados. Neste sentido, enquanto o hemisfério direito parece deflagrar as respostas mal adaptadas ao estresse, o hemisfério esquerdo bloquearia esse efeito (COSTA et al., 2016). Desta forma, torna-se necessário o estudo do efeito do NMDA e do óxido nítrico no córtex pré-frontal, através da injeção de drogas em concentrações sem efeito intrínseco (simulando um estado fisiológico) na ansiedade para avaliar a influência glutamatérgica e nitrérgica no comportamento de animais estressados ou não, e expostos ao LCE. Portanto, uma das hipóteses do presente trabalho prediz ser a ativação glutamatérgica, através do agonista NMDA no CPFmE, suficiente para reverter a ansiedade induzida pela derrota social. A segunda hipótese prevê que o bloqueio da NOS neuronal no CPFmD atenua a ansiedade em animais expostos ao LCE.

2. OBJETIVO

Geral:

Investigar o papel do complexo glutamato/receptor NMDA e do óxido nítrico no córtex pré-frontal medial de camundongos derrotados e/ou expostos ao labirinto em cruz elevado.

Específicos:

Avaliar os efeitos da injeção intra-CPFmE de NMDA sobre a ansiedade em camundongos previamente submetidos ao estresse de derrota social e expostos ao labirinto em cruz elevado.

Investigar os efeitos da injeção intra-CPFmD de NPLA, um inibidor da síntese de NO, em camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Sujeitos

Foram utilizados camundongos Swiss-Webster machos (25-35g), provenientes do biotério central da Universidade Estadual Paulista – UNESP (Campus de Botucatu), mantidos em condições controladas de temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) e luz (ciclo claro/escuro de 12 horas) e livre acesso ao alimento e à água, exceto durante os curtos períodos de teste. Os experimentos começaram após aprovação pelo comitê de ética local CEUA/FCF/Ar, protocolos nº15/2018 (Anexo 1) e nº13/2019 (Anexo 2).

3.2 Cirurgia e administração de drogas intra-CPFm

Os camundongos, sob anestesia geral pela associação de anestésico + relaxante muscular (cetamina 100 mg/Kg + xilazina 10 mg/Kg, i.p.), receberam a implantação de cânula guia (26 gauge) de 7,0 mm de comprimento intra-CPFm direito ou esquerdo, fixada no crânio do animal com cimento acrílico. A ponta da cânula guia foi posicionada + 1,0 mm dorsal à estrutura alvo e as coordenadas foram baseadas no atlas de Paxinos e Franklin (2001), correspondendo a +1,5 mm anterior ao bregma, +/- 0,3 mm lateral à sutura sagital dependendo do hemisfério e -1,5 mm ventral à superfície craniana. Ao término da cirurgia, como medida profilática, os camundongos receberam uma injeção intramuscular de penicilina-G benzatina (Pentabiótico®, 56,7 mg/kg em um volume de 0,1 mL) e uma injeção subcutânea do analgésico anti-inflamatório Banamine® (megluminato de flunixin, 3,5 mg/kg em um volume de 0,3 mL). A injeção das soluções (ver seção 3.3) foi realizada de cinco a sete dias após a cirurgia, através da inserção de uma agulha (33 gauge) de 8,0 mm de comprimento no interior da cânula guia conectada a um tubo de polietileno (PE-10), o qual permitiu

monitorar o movimento de uma pequena bolha de ar no tubo confirmando o fluxo da solução durante as injeções com auxílio de uma micro-seringa da marca Hamilton.

3.3 Drogas

As drogas utilizadas foram um agonista de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA em concentração sem efeitos intrínsecos na ansiedade, previamente determinada por estudo piloto (N-metil-D-aspartato (NMDA) – $0,02 \text{ nmol}/0,2 \mu\text{L}$); um inibidor da óxido nítrico sintase (N ω -propol-L-arginina (NPLA) – $0,04 \text{ nmol}/0,1 \mu\text{L}$, $0,02 \text{ nmol}/0,1 \mu\text{L}$); e solução salina fisiológica 0,9% para o grupo controle. (MIGUEL, 2008; VILA-VERDE, 2016; CARDOSO, 2017).

3.4 Derrota social

No dia do teste, dez minutos após a injeção de NMDA no CPFmE, os camundongos intrusos foram individualmente colocados na caixa do agressor, o qual vive isolado por, no mínimo, 4 semanas, para intensificar seu comportamento agressivo (VALZELLI, 1981). A derrota social é definida pela exibição da postura de submissão pelo intruso (por pelo menos 3 segundos ou por um período total máximo de 5 minutos de agressão, o que ocorrer primeiro). Desta forma, foram considerados derrotados aqueles animais que interagiram com o agressor a maior parte do tempo e mostraram de forma contundente a postura de submissão por 3 segundos. Caso não exibissem a postura de submissão, eram retirados do estudo. Posteriormente, os animais retornaram para uma caixa moradia e cinco minutos depois, cada animal foi exposto ao LCE para a avaliação das reações de defesa.

3.5 Histologia

Após o término dos experimentos todos os animais foram submetidos à anestesia profunda com uretana (10 mg/Kg) e submetidos à injeção intra-CPFm de uma solução de 1% de azul de Evans (procedimento semelhante ao descrito para injeção das drogas em estudo). Em seguida, foram eutanasiados em câmara de CO₂, decapitados e seus encéfalos removidos e reservados em recipientes contendo solução de formalina (10%) para posteriormente sofrerem seções coronais (ao longo do trajeto da cânula), com o auxílio de um criostato (Leica, C.M. 1850). Os cortes foram inspecionados com o uso de um microscópio (Leica, D.M LB), no qual, a visualização da dispersão do azul de Evans indicava o local da injeção. A localização das regiões de injeção foram identificadas com o auxílio do atlas Paxinos e Franklin (2001). As subregiões do CPFmE consideradas positivas foram Cingulado 1 (Cg 1) e pré-límbico (PrL), uma vez que resultados inconsistentes foram observados com injeções fora destas áreas. (COSTA et. al. 2016).

3.6 Delineamento experimental

3.6.1 Experimento 1: Efeito da microinjeção de NMDA no CPFm Esquerdo no comportamento defensivo de camundongos socialmente derrotados expostos ao LCE.

Avaliação do efeito da ativação do CPFmE nas reações de defesa de camundongos expostos ao LCE: De cinco a sete dias após a cirurgia estereotáxica, os camundongos receberam microinjeção intra-CPFmE de NMDA [0,02 nmol/0,2 µL (n=7) ou salina (n = 10)]. Após quinze minutos, cada animal foi exposto ao LCE durante cinco minutos para o registro dos comportamentos descritos no item 3.6,

durante cinco minutos. Os camundongos foram testados sob condições de baixa luminosidade (aproximadamente 50 lux).

Avaliação do efeito da ativação do CPFmE nas reações de defesa de animais derrotados socialmente e expostos ao LCE: De cinco a sete dias após a cirurgia estereotáxica, os camundongos receberam microinjeção intra-CPFm esquerdo de NMDA [0,02 nmol/0,2 μ L (n=8) ou salina (n=11)]. Após dez minutos, cada animal foi submetido ao estresse de derrota social, sendo individualmente colocados na caixa do agressor, para serem atacados pelo residente e, cinco minutos depois exposto ao LCE para o registro dos comportamentos descritos no item 3.6, durante cinco minutos. Os camundongos foram testados sob condições de baixa luminosidade (aproximadamente 50 lux).

3.6.2 *Experimento 2:* Efeito da microinjeção de NPLA no CPFm Direito no comportamento defensivo de camundongos expostos ao LCE.

De cinco a sete dias após a cirurgia estereotáxica, os camundongos receberam microinjeção intra-CPFmD de NPLA [0,04 nmol/0,1 μ L (n=7) ou 0,02 nmol/0,1 μ L (n=10) ou salina (n=10)]. Após quinze minutos, cada animal foi exposto ao LCE durante cinco minutos para o registro dos comportamentos descritos no item 3.6, durante cinco minutos. Os camundongos foram testados sob condições de pouca luz (aproximadamente 50 lux).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos ao teste de homogeneidade de variância de Levene. Em seguida, submetidos à análise de variância (ANOVA) bifatorial no Exp. 1

(fator 1 – condição; fator 2 – tratamento) ou unifatorial no Exp. 2 (fator – tratamento) seguida pelo teste posthoc de Duncan. Os valores considerados significativos foram com $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Injeções no CPFm

A Figura 4 mostra um diagrama esquemático (esquerda) e uma fotomicrografia representativa (direita) do sítio de infusão no CPFm de camundongo (PAXINOS; FRANKLIN, 2001). As injeções foram consideradas positivas nas sub-regiões dorsais (Cg1 e PrL).

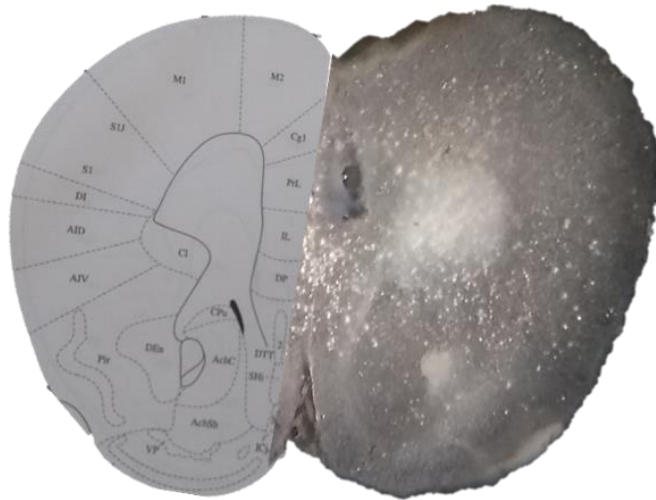


Figura 6. Diagrama esquemático (esquerda) e fotomicrográfico (direita) de um sítio de microinfusão representativo no CPFm de camundongo. A seção corresponde a 1,70 mm anterior ao bregma (Paxinos; Franklin, 2001). Abreviações: Cg1 – córtex cingulado área 1; IL – córtex infralímbico; PrL – córtex pré-límbico.

4.2 Experimentos

4.2.1 Experimento 1: Ausência de efeitos da microinjeção de NMDA no CPFm Esquerdo no comportamento defensivo de camundongos socialmente derrotados expostos ao LCE.

A Figura 7 mostra a ausência de efeitos da injeção intra-CPFmE de NMDA (0,02 nmol) no comportamento de camundongos expostos ao LCE. A ANOVA bifatorial não revelou quaisquer efeitos nos parâmetros espaço-temporais analisados ($F_{1,17} \leq 2,45$; $p > 0,05$). A mesma análise também não detectou efeitos induzidos pelo estresse de derrota social ($p > 0,05$).

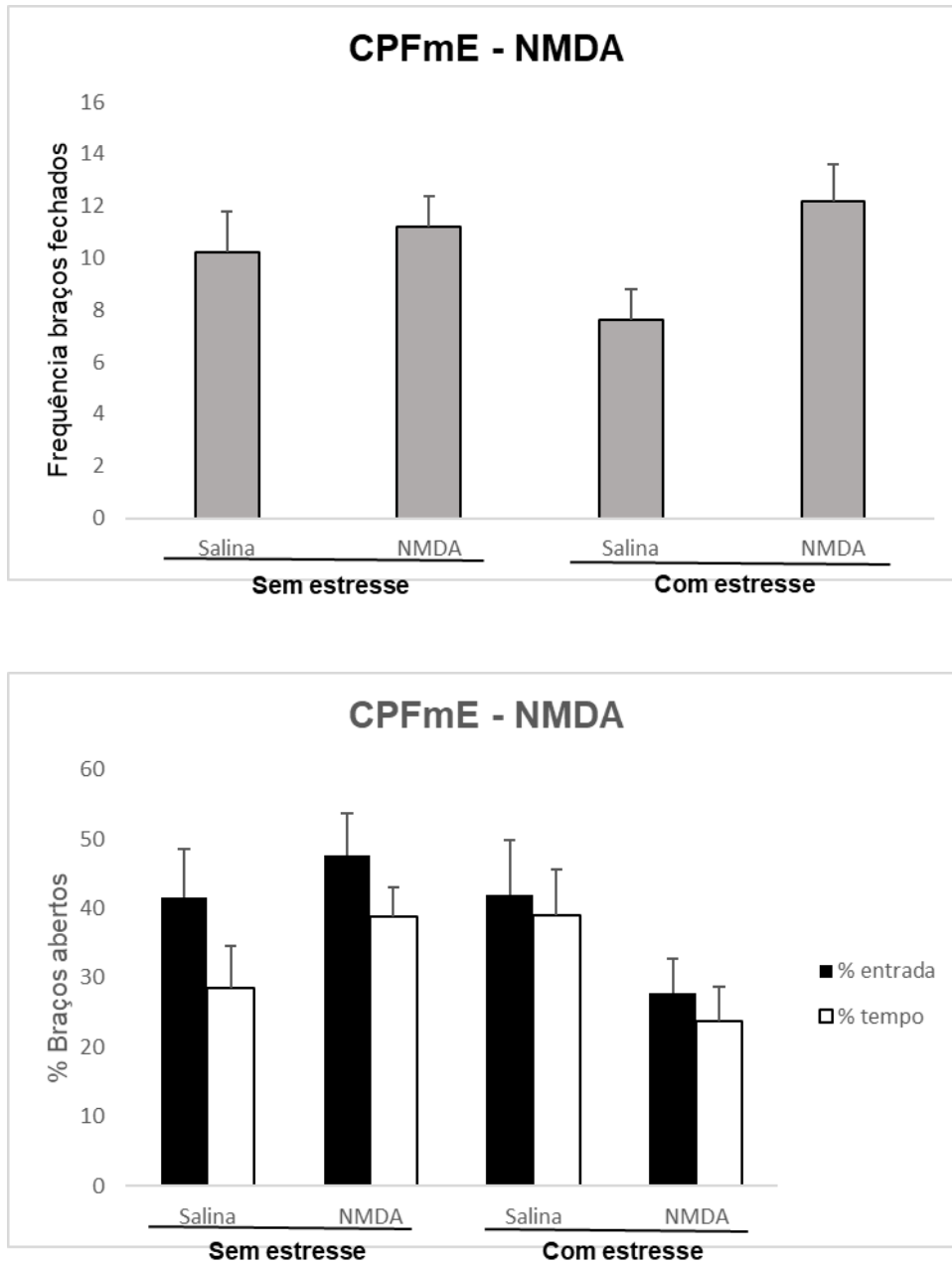


Figura 7. Efeitos da injeção de NMDA (0,02 nmol/ 0,2 μ L) no CPFmE sobre o comportamento espaço-temporal de camundongos derrotados socialmente e expostos ao LCE. As colunas representam médias (\pm EPM); ANOVA bifatorial. N = 8 - 11 por grupo.

4.2.2 Experimento 2: Efeito ansiolítico da microinjeção de NPLA no CPFm Direito no comportamento defensivo de camundongos expostos ao LCE.

A Figura 8 mostra o efeito ansiolítico do inibidor da NOSn, NPLA 0,04 nmol, intra-CPFmD, no comportamento espaço-temporal de camundongos expostos ao LCE. A ANOVA unifatorial apontou significância para % tempo nos braços abertos ($F_{2,22}=7,02$; $p<0,05$) e para % de entrada nos braços abertos ($F_{2,20}=6,35$; $p<0,05$). Não houve diferenças para o parâmetro de entradas nos braços fechados ($F_{2,20}=0,99$; $p>0,05$). O teste *posthoc* de Duncan confirmou que o grupo tratado com NPLA 0,04 nmol explorou mais os braços abertos do LCE em relação com grupo controle ($p<0,05$).

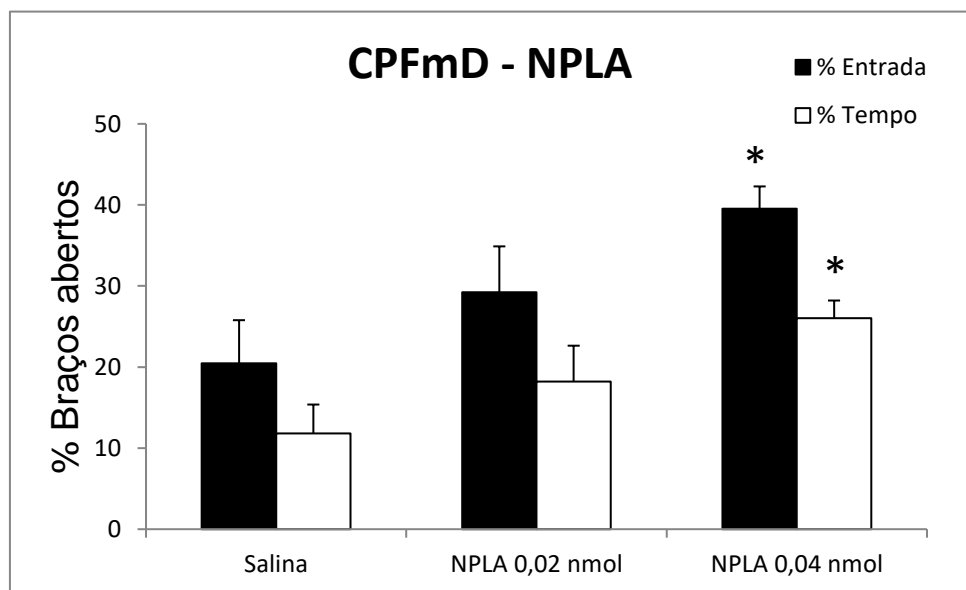
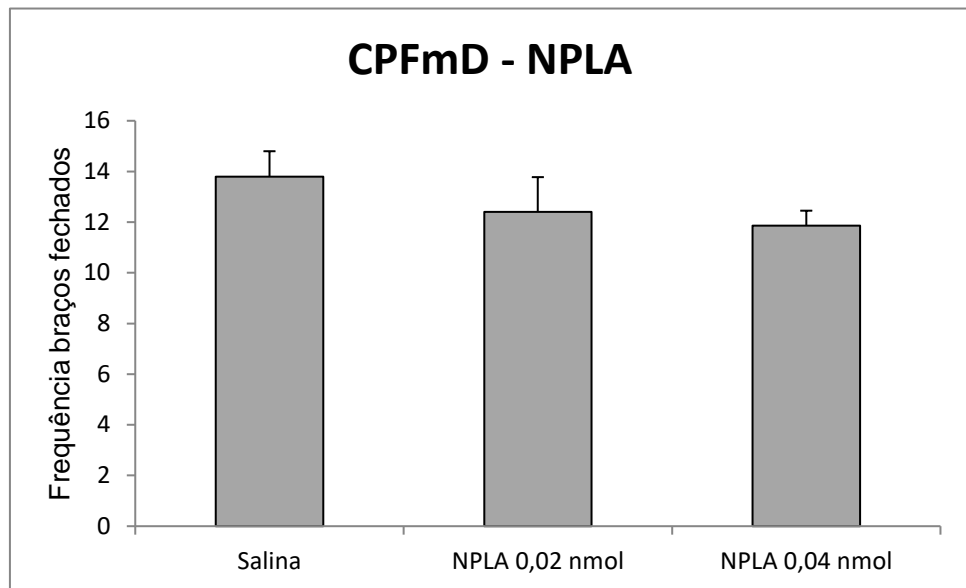


Figura 8. Efeitos da injeção de NPLA (0,02 ou 0,04 nmol/ 0,1 μ L) no CPFmD sobre o comportamento espaço-temporal de camundongos expostos ao LCE. As colunas representam médias (\pm EPM) N = 7-10 por grupo. * $p \leq 0,05$ em comparação ao controle.

5. DISCUSSÃO

Este estudo teve a finalidade de contribuir para mostrar o papel da transmissão glutamatérgica e nitrérgica no CPF medial no comportamento de animais derrotados ou não, e expostos ao LCE.

Os resultados dos experimentos demonstraram que (1) a injeção intra-CPFmE de NMDA 0,02 nmol/0,2 µL em camundongos expostos ao LCE, independente do estresse, não resultou em diferença significativa nas medidas espaço-temporais quando comparados ao grupo veículo; (2) a injeção intra-CPFmD de NPLA 0,04 nmol/0,1 µL em camundongos expostos ao LCE, resultou em um efeito ansiolítico quando comparados ao grupo veículo, o que não ocorreu com a menor dose (0,02 nmol).

Resultados recentes do nosso grupo de pesquisa mostraram que a inativação temporária do CPFm direito ou esquerdo, através do cloreto de cobalto (CoCl₂), um inibidor sináptico, promove, respectivamente, efeitos ansiolítico e ansiogênico em camundongos expostos ao LCE (COSTA, 2014). De modo similar, a ativação nitrérgica do CPFmD, através do NOC – 9, promove efeito ansiogênico no LCE, contudo, o mesmo não é observado quando a mesma droga é injetada no CPFm Esquerdo ou bilateral, corroborando os dados de lateralização funcional desta estrutura. No âmbito da derrota social, a inibição sináptica temporária no CPFmE anterior ao estresse promove efeito ansiogênico observado no LCE 24h após o estímulo estressor, podendo perdurar por até 10 dias (VICTORIANO et al., 2020). Todavia, esse efeito pode ser revertido pelo bloqueio dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA no CPFmD, utilizando AP7. Assim, camundongos derrotados socialmente voltaram a explorar o aparato do LCE após o bloqueio dos receptores NDMA no CPFmD, sugerindo que o glutamato participa da ansiedade induzida pelo

estresse quando liberado no hemisfério direito do CPFm. Esses efeitos não foram observados em animais que sofreram o estresse com o córtex esquerdo intacto, sugerindo que a integridade do CPFmE é importante para que os animais lidem de maneira adequada a um estressor. (COSTA, 2016; VICTORIANO et. al. 2020).

No experimento 1 foi investigado o efeito da ativação do CPFm Esquerdo, através da injeção de NMDA, no comportamento defensivo de camundongos socialmente derrotados expostos ao LCE. Como mostrado na Figura 7, a injeção intra-CPFmE de NMDA 0,02 nmol/0,2 µL em camundongos expostos ao LCE, independente do estresse, não resultou em diferença significativa nas medidas espaço-temporais, representadas pelo número de entradas e tempo de permanência nos braços abertos do aparato, quando comparados ao grupo veículo.

Costa e colaboradores (2016) mostraram que a derrota social produz um efeito agudo do tipo ansiogênico, sendo evidenciado pela diminuição da exploração dos braços abertos pelos animais expostos ao LCE 5 minutos após o estresse (COSTA et al., 2016). Ademais, Victoriano e colaboradores (2020) contribuíram para mostrar que o efeito ansiogênico pode perdurar por dez dias se os animais foram expostos à derrota com o CPFmE temporariamente inativado (VICTORIANO et al., 2020). Logo, tendo em vista a alta exploração dos animais veículo nas áreas desprotegidas, e, não havendo diferença significativa entre os submetidos ou não ao estresse, podemos deduzir que o protocolo de derrota social parece não induzir ansiogênese nos animais.

Portanto, tendo em vista que a inibição do CPFmE facilita a ansiedade induzida pela derrota social, a sua ativação prejudicaria a ocorrência da ansiogênese em animais derrotados. Entretanto, se o protocolo de estresse utilizado não é suficiente

para gerar ansiogênese, não se pode confirmar a hipótese, visto que esta é uma etapa importante dentro do processo.

Considerando os resultados obtidos, cogitou-se alterar o protocolo de estresse, a fim de induzir ansiogênese nos animais; alterar a dose de NMDA utilizada, para uma com efeito intrínseco; ou até mesmo substituí-la por NPLA.

Logo, optou-se por fazer a substituição por NPLA. Desta forma, realizou-se o experimento 2, onde foram investigados os efeitos da inibição da enzima óxido nítrico sintase (NOSn) no comportamento defensivo de camundongos expostos ao LCE, via injeção intra-CPFmD de NPLA nas doses de 0,02 nmol e 0,04 nmol. Os resultados mostraram efeito ansiolítico promovido pela maior dose utilizada, o que ocasionou diferença significativa nos comportamentos de defesa, representado pelo tempo de permanência nos braços abertos do aparato, quando comparados ao grupo veículo. Contudo, o mesmo não ocorreu com a menor dose (0,02 nmol), a qual teve um perfil comportamental de locomoção e defesa similares ao do grupo veículo, como mostrado na Figura 8.

Conforme demonstrado anteriormente por Costa e colaboradores (2016), a injeção intra-CPFmD de NOC-9, um doador de óxido nítrico, provocou diminuição da exploração das áreas desprotegidas do LCE, produzindo um efeito ansiogênico. Desse modo, considerando que o NPLA bloqueia a enzima NOSn, sugere-se que concentração de NO no CPFmD tenha diminuído e ocorreria um efeito ansiolítico nos animais expostos ao LCE, como o apresentado pela dose de 0,04 nmol.

Em suma, os resultados mostram que o NO localizado no CPFmD tem um importante papel na expressão da ansiedade em camundongos expostos ao LCE,

uma vez que a inibição de sua síntese resultou em maior exploração dos braços abertos do aparato. Assim sendo, considera-se desenvolver um protocolo de derrota que induza ansiogênese, para testar a hipótese de que o NMDA e o NPLA em doses sem efeito intrínseco tenham algum efeito protetivo no CPFm esquerdo e direito, respectivamente, no contexto do estresse.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram que o protocolo usado para a exposição aguda ao estresse de derrota social não promoveu efeito ansiogênico, o que seria evidenciado pela redução de parâmetros de ansiedade, como diminuição de exploração dos braços abertos, dos camundongos derrotados expostos ao LCE. Além disso, parece que a exposição de roedores ao modelo de ansiedade do LCE recruta óxido nítrico no CPFmD, corroborando evidências acerca da lateralização funcional desta estrutura investigada pelo nosso laboratório (COSTA et al., 2016). Resta avaliar a influência do inibidor da NOSn no outro hemisfério e no contexto da derrota social uma vez estabelecido um protocolo efetivo em induzir ansiedade.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, D.C.; GUIMARÃES F.S. Blockade of NMDA or NO in the dorsal premammillary nucleus attenuates defensive behaviors. **Physiol Behav**, v.103, p.279–283, 2011.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders**. 5th ed. Washington, DC: Academic Press, v.1, 2013

ANDREATINI, R.; BOERNGEN-LACERDA, R.; ZORZETTO FILHO, D. Tratamento farmacológico do transtorno de ansiedade generalizada: perspectivas futuras. **Rev. Bras. Psiquiatr.** v.23, n. 4, p.233-242, 2001.

BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C. Bringing natural behaviors into the laboratory: a tribute to Paul McLean. **Physiol. Behav.**, v.79, n.3, p.515-24, 2003.

BLANCHARD, R.J, et al. Defensive system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. **Behav. Brain Res.**, v.58, n.1-2, p.155-65, 1993.

BLANCHARD, D.C. et al. Human defensive behaviors to threat scenarios show parallels to fear- and anxiety-related defense patterns of non-humans mammals. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.25, n.7-8, p.761-70, 2001.

BRANDAO, M.L.; VIANNA, D.M.; MASSON, S.; SANTOS, J. Organização neural de diferentes tipos de medo e suas implicações na ansiedade. **Rev. Bras. Psiquiatr.** v. 25, suppl.2, p. 36-42, 2003.

BANDLER, R.; DEPAULIS, A. A. **Midbrain periaqueductal gray control of defensive behavior in the cat and rat**. The midbrain periaqueductal gray matter: functional, anatomical and neurochemical organization. New York: Plenum Press, p.175-98, 1991.

BECHARA, A.; DAMASIO, H., Decision-making and addiction (part 1): impaired activation of somatic states in substance dependent individuals when pondering decisions with negative future consequences. **Neuropsychologia**, v.40, n. 10, p. 1675-1689, 2002.

BEHBEHANI, M. M. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. **Prog Neurobiol**, v.46, n. 6, p.575-605, 1995.

BJÖRKQVIST, K. Social defeat as a stressor in humans. **Physiology & Behavior**, v. 73, n. 3, p.435-442, 2001.

BRAGA, J. E .F; PORDEUS, L. C.; SILVA, A. T. M .C; PIMENTA, F. C. F.; DINIZ, M. F. M. F.; ALMEIDA, R. N.; Ansiedade Patológica: Bases Neurais e Avanços na Abordagem Psicofarmacológica. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v.14, n.2, p.93-100, 2010

BRANDAO, M. L. et al. [Neural organization of different types of fear: implications for the understanding of anxiety]. **Rev Bras Psiquiatr**, v.25 Suppl 2, p.36-41, 2003.

CARDOSO, B. S. **O papel do Córtex Pré-Frontal medial Esquerdo (CPFmE) no comportamento defensivo de camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado (LCE)**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Araraquara, 2017.

CAMILO, P. N. **Resiliência e superação em condições adversas**. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Psicologia) - Pontifícia Universidade Católica de Goiás, 2011.

CAROBREZ, A.P. Transmissão pelo glutamato como alvo molecular na ansiedade. **Rev. Bras. Psiquiatr**. v.25, suppl. 2, p.52-58, 2003.

CARRIVE, P. et al. Conditioned fear to context is associated with increased Fos expression in the caudal ventrolateral region of the midbrain periaqueductal gray. **Neuroscience**, v.78, n. 1, p.165-77, 1997.

CARRILLO, J. F. S. **Suscetibilidade e resiliência aos efeitos da subjugação social prolongada em camundongos machos adolescentes: estudo da enzima neuronal de síntese do óxido nítrico (nNOS)**. 2017. Dissertação. (Mestrado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, USP, 2017.

CARVALHO-NETTO EF. Medo e ansiedade: aspectos comportamentais e neuroanatômicos. **Arq. Med Hosp Faculdade de Ciências Médicas Santa Casa São Paulo**, p.54-62, 2009.

CÉLIA, S. Promoção da saúde e resiliência. In: FICHTNER, N. (org) **Prevenção, Diagnóstico e Tratamento dos Transtornos Mentais da Infância e da Adolescência: um enfoque desenvolvimental**. Porto Alegre: Artes Médicas p. 21-25, 1997.

CONNOR, K. M.; DAVIDSON, J. R. T. **Depression and Anxiety**, v. 18, p. 76-82, 2003. doi: 10.1002/da.10113.

COSTA, N. S. **Avaliação farmacológica do papel do córtex pré-frontal medial no comportamento defensivo de camundongos**. 2014. 49 fl. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Araraquara, 2014.

COSTA, N.S. et al., Functional lateralization of the medial prefrontal cortex in the modulation of anxiety in mice: Left or right? **Neuropharmacology**, v.108, p.82-90, 2016

COURTIN, J. et al. Medial prefrontal cortex neuronal circuits in fear behavior. **Neuroscience**, v.240, p.219-242, 2013.

DAMASIO, A. R.; EIGHTH, C. U., The fabric of the mind: a neurobiological perspective. **Progress in Brain Research**, v.126, p.457-467, 2000

DIRETRIZES CLÍNICAS, Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos (COMHUPES) Benzodiazepínicos: Características, Indicações, Vantagens e Desvantagens, 2013.

EUSTON, D.R.; GRUBER, A.J.; McNAUGHTON, B.L. The role of the medial prefrontal cortex in memory and decision making. **Neuron**, v.76, p. 1057-70, 2012. apud ITOI, K.; SUGIMOTO, N. The brainstem noradrenergic systems in stress, anxiety and depression. **J. Neuroendocrinol.** v.22, p.355-361, 2010.

FANSELOW, M. S. The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety. In: DEPAULIS, A. A.; BANDLER, R. (Ed.). **The Midbrain Periaqueductal Gray Matter**. New York: Plenum Press. p.151-73, 1991.

FARIA, M. P. et al. 2016. Anxiety-like responses induced by nitric oxide within the BNST in mice: role of CRF1 and NMDA receptors. **Hormones and Behavior**, v.79, p. 74-83, 2016.

GALLY, J.A. et al. The NO hypothesis: possible effects of a short-lived, rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.87, p.3547-51, 1990.

GALVÃO-COELHO, N. L.; SILVA, H. P. A.; SOUSA, M. B. C. Resposta ao estresse: II. Resiliência e vulnerabilidade. **Estudos de Psicologia**, v. 20, n. 2, Abril/Junho, 2015. <https://doi.org/10.5935/1678-4669.20150009>.

GARMEZY, N. **Reflections and comentaryon risk, resilience, and development**. Cambridge: Cambridge University Press, 1996.

GARTHWAITE, J.; CHARLES, S.L.; CHESS-WILLIAMS, R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. **Nature**, v.336, p.385-8, 1988.

GEE, D.G., CASEY, B.J. The impact of developmental timing for stress and recovery. **Neurobiology of Stress**, v.1, p.184-194, 2015

GOLD, A. L.; MOREY, R. A.; MCCARTHY, G. Amygdala-prefrontal cortex functional connectivity during threat-induced anxiety and goal distraction. **Biological Psychiatry**, v.77, n. 4, p.394-403, 2015.

GONZALEZ, L.E.; RUJANO, M.; TUCCI, S.; PAREDES, D.; SILVA, E.; ALBA, G.; HERNANDES, L. Medial prefrontal transection enhances social interaction. I:behavioral studies. **Brain Res**. v.887, n. 1, p.7-15, 2000.

GRAEFF, F. G. Ansiedade. In: GUIMARÃES, F.S. **Fundamentos da Psicofarmacologia**. São Paulo: Edit. Atheneu. p.165-204, 2012.

GRAEFF, F. G. et al. Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic. **Behav. Brain Res**, v. 58, n. 1-2, p. 123-31, 1993.

GRAEFF, F.G.; BRANDÃO, M.L. eds., **Neurobiologia das Doenças Mentais**. 3. ed. São Paulo: Lemos Editorial e Gráficos Ltda. p.109-144, 1996.

GRAEFF, F. G. Serotonina, matéria cinzenta periaqueductal e transtorno do pânico. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, São Paulo, v. 25, supl. 2, p. 42-45, 2003 .

GRAY, J.A.; McNAUGHTON, N. **The Neuropsychology of Anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system**, 2. ed. Oxford: Oxford University Press, 2000.

GRUBER, A. J. et al. More is less: a disinhibited prefrontal cortex impairs cognitive flexibility. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 50, p. 17102-10, 2010.

GUIX, F. X. et al. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. **Progress in Neurobiology**, v. 76, n. 2, p. 126-52, 2005.

HANDLEY, S.L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonist and antagonists in a maze-exploration model of fear-motivated behaviour. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v. 327, n.1, p.1-5, 1984.

KEENEY, A. J.; HOGG, S. Behavioural consequences of repeated social defeat in the mouse: preliminary evaluation of a potential animal model of depression. **Behavioral Pharmacology**, v. 10, n. 8, p. 753-764, 1999.

KORTE, S. M.; KOOLHAAS, J. M.; WINGFIELD J. C.; McEWEN, B. S. The Darwinian concept of stress: Benefits of allostasis and costs of allostatic load and the trade-offs in health and disease. **Neurosci Biobehav Rev.** v. 29, n. 1, p. 3-38. 2005. doi: 10.1016/j.neubiorev.2004.08.009.

KRISHNAN, V.; HAN, M. H.; GRAHAN, D. L.; BERTON, O.; RENTHAL, W.; RUSSO, S. J.; et. Al. Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. **Cell**, v. 131, n. 2, p. 391-404, 2007. doi: 10.1016/j.cell.2007.09.018.

KRISHNAN, V. Defeating the fear: New insights into the neurobiology of stress susceptibility. **Experimental Neurology**, v. 261, p. 412-426, 2014. doi: 10.1016/j.expneurol.2014.05.012.

LACROIX, L; SPINELLI, S., HEIDBREDER, C.A; FELDON, J. Differential role of the medial and lateral prefrontal cortices in fear and anxiety. **Behav. Neurosci.** v. 114, n. 6, p. 1119-1130, 2000. doi: 10.1037//0735-7044.114.6.1119.

LANG, P. J.; BRADLEY, M. M.; CUTHBERT, B. N. Emotion, motivation, and anxiety: brain mechanisms and psychophysiology. **Biol Psychiatry**, v. 44, n. 12, p. 1248-63, 1998.

LAVIOLA, G. et al. Psychobiological risk factors for vulnerability to psychostimulants in human adolescents and animal models. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 7, p. 993-1010, 1999.

LENHARDK, G; CALVETTI, P. U. Quando a ansiedade vira doença? Como tratar transtornos ansiosos sob a perspectiva cognitivo-comportamental. **Aletheia**, v. 50, n.1-2, p.111-122, 2017.

LISBOA, S. F. et al, Anxiety-Behavior Modulated by Ventral Medial Prefrontal Cortex of Rats Submitted to the Vogel Conflict Test Involves a Local NMDA Receptor and Nitric Oxide. **Journal of Behavioral and Brain Science**, v. 1, p.181-187, 2011.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 92, n. 2, p. 180-5, 1987.

LOVICK, T. A. Panic disorder - A malfunction of multiple transmitter control systems within the midbrain periaqueductal gray matter? **Neuroscientist**, v. 6, n. 1, p.48-59, 2000.

MAREN, S.; HOLMES, A. Stress and fear extinction. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 1, p.58-79, 2016. doi:10.1038/npp.2015.180; published online 29 July 2015

MARGIS, R.; PICON, P.; COSNER, A. F.; SILVEIRA, R. O.; Relação entre estressores, estresse e ansiedade. **Rev. Psiquiatria**, v. 25, p.65-74, abril 2003.

McNAUGHTON, N.; CORR, P. J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.2 8, p.285-305, 2004.

MICZEK, K. A.; THOMPSON, M. L.; SHUSTER, L. Opioid-like analgesia in defeated mice. **Science**, v.215, p.1520–1522, 1982.

MIGUEL, T. T.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Anxiogenic-like effects induced by NMDA receptor activation are prevented by inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the periaqueductal gray in mice. **Brain Research**, v.1240, p.39-46, 2008

MORATO, Silvio. O papel da visão na aversão aos espaços abertos no labirinto em cruz elevado. **Psicol. USP**, São Paulo, v.17, n. 4, p.159-174, 2006 .

NUTT, DJ. The pharmacology of human anxiety. **Pharmacol Ther.** v.47, n. 2, p.233-266, 1990.

OMS-World Health Organization. Depression and other common mental disorders: global health estimates. Geneva: World Health Organization, 2017. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/254610>. Licença: CC BY-NC-SA 3.0 IGO

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J. **The mouse brain in stereotaxic coordinates**. California, USA: Academic Press, 2001.

PELLOW, S. et al. M. Validation of open-closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience and Methods**, v.14, p.149-67, 1985.

QUEIROZ, S.L.; BATISTA, A.A. Funções biológicas do óxido nítrico. **Quím. Nova**, São Paulo , v. 22, n. 4, p.584-590, 1999.

RESSTEL, L.B.; SOUZA, R.F.; CORRÊA, F.M.; GUIMARÃES, F.S. Anxiolytic-like effects induced by medial prefrontal cortex inhibition in rats submitted to the Vogel conflict test. **Physiol Behav.** v. 93, n. 1-2, p.200–205, 2008.

RESSTEL, L.B.; CORRÊA, F.M.; GUIMARÃES, F.S. The expression of contextual fear conditioning involves activation of an NMDA receptor-nitric oxide pathway in the medial prefrontal cortex. **Cerebral Cortex**, v. 18, n. 9, p. 2027-2035, 2008.

SELYE, H. **Stress, a tensão da vida**. São Paulo: Ibrasa - Instituição Brasileira de Difusão Cultural, 1959.

SHAH, A.A.; TREITE, D. Excitotoxic lesions of the medial pfc attenuate fear responses in the epm, social interaction and shock probe burying tests. **Brain Res.** v.969, n. 1-2, p.183-194. doi: 10.1016/s0006-8993(03)02299-6.

STEIN, D. J.; BOUWER, C. A neuro-evolutionary approach to the anxiety disorders. **Journal of Anxiety Disorders**, v.11, n. 4, p.409-429, 1997.

VALZELLI, L. (Ed). **Psychobiology of aggression and violence**. New York: Raven Press, 1981

VANLTALLIE, T. B. Stress: A risk factor for serious illness. **Metabolism**, v.51, n. 6, Suppl 1, p.40-45. 2002. doi: 10.1053/meta.2002.33191.

VERMETTEN, E.; BREMNER, J.D. Circuits and systems in stress. II. Applications to neurobiology and treatment in posttraumatic stress disorder. **Depression and Anxiety**, v. 16, n. 1, p.14-38, 2002.

VICTORIANO, G. **Papel do córtex pré-frontal medial na ansiedade induzida pelo estresse de derrota social em camundongos.** Orientador: Ricardo Luiz Nunes de Souza. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de São Carlos, 2018.

VILA-VERDE, C.; MARINHO, A. L. Z.; LISBOA, S. F.; GUIMARÃES, F. S.; Nitric oxide in the prelimbic medial prefrontal cortex is involved in the anxiogenic-like effect induced by acute restraint stress in rats. **Neuroscience**, v.320, p. 0-42, 2016.

WALKER, P.; CARRIVE, P. Role of ventrolateral periaqueductal gray neurons in the behavioral and cardiovascular responses to contextual conditioned fear and poststress recovery. **Neuroscience**, v.116, n. 3, p.897-912, 2003.

YUAN, P.; RAZ, N., Prefrontal cortex and executive functions in healthy adults: a meta-analysis of structural neuroimaging studies. **Neuroscience Biobehavioural Reviews**, v.42, p.180-192, 2014.

Anexo 1



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada "Papel do Córtex Pré-Frontal medial Esquerdo (CPFmE) no comportamento defensivo de camundongos submetidos ao estresse de derrota social", registrada com o Protocolo CEUA/FCF/CAR: 15/2018, sob a responsabilidade da Pesquisadora Ingrid Queiroz da Silva, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), 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 de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP em reunião de 20 de junho de 2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Agosto de 2018
Espécie/linhagem/raça	Camundongo Heterogênico Suíço-Webster 75/ M 25-35g
Nº de animais	75
Peso/Idade	25 a 35 gramas/ 4 semanas
Sexo	Masculino
Origem	Biotério Central de Botucatu

Araraquara, 20 de junho de 2018.

Profa. Dra. CARLA RAQUEL FONTANA
Coordenadora da CEUA

Anexo 2

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos da inibição da síntese de óxido nítrico no córtex pré-frontal medial direito (CPFmD) no comportamento ansiogênico induzido pela derrota social em camundongos", registrada com o Protocolo CEUA/FCF/CAR: 07/2019, sob a responsabilidade da pesquisadora Ingrid Queiroz da Silva que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), 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 de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP em reunião realizada em 17 de Junho de 2019.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Agosto 2020
Espécie/linhagem/raça	Camundongo Suíços-Webster
Nº de animais	75
Peso/idade	4 semanas (25-35g)
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da UNESP - Botucatu/SP
Registro CIAEP	02.00082.2019

Araraquara, 24 de Junho de 2019.

Prof Dr Marcelo Tadeu Marin
Coordenador da CEUA