

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ADAM HIDEO SUGI

DESENVOLVIMENTO DE SOFTWARE PARA A ANÁLISE DE DADOS  
DE VOLTAMETRIA CÍCLICA DE VARREDURA RÁPIDA

CURITIBA

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ADAM HIDEO SUGI

DESENVOLVIMENTO DE SOFTWARE PARA A ANÁLISE DE DADOS  
DE VOLTAMETRIA CÍCLICA DE VARREDURA RÁPIDA

Monografia apresentada à disciplina  
Trabalho de Conclusão de Curso I como  
requisito parcial à conclusão do Curso  
de Biomedicina, Setor de Ciências  
Biológicas, Universidade Federal do  
Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio da Cunha

CURITIBA

2016

## RESUMO

A dopamina (DA) é um neurotransmissor que participa na modulação de funções motoras, comportamentais e emocionais, influenciando também processos como aprendizado e dependência de drogas de abuso. Alterações nos níveis de DA também estão relacionadas ao desenvolvimento de diversas patologias, a exemplo da doença de Parkinson. A liberação de DA nas fendas sinápticas pode ocorrer de forma tônica (lenta e em pequenas quantidades, da ordem de nanomolar) ou fásica (rápida e em grandes quantidades, da ordem de micromolar). A liberação fásica em particular apresenta grande influência na determinação de diversos tipos de comportamento, bem como na tomada de decisões e no efeito reforçador. Diversos métodos foram desenvolvidos para a identificação de variações de concentração da dopamina *in vivo*. Atualmente, a técnica que se demonstra mais eficiente para o registro e identificação da liberação fásica de DA é a voltametria cíclica de varredura rápida (VCVR), pois apresenta uma maior seletividade e uma resolução temporal adequada para a detecção das rápidas alterações na concentração deste neurotransmissor. Entretanto, a técnica possui alguns empecilhos, uma vez que eletrodos muito sensíveis são utilizados para os registros, interferências elétricas podem comprometer a qualidade do sinal. Além disso, devido à alta resolução temporal desta técnica, uma grande quantidade de dados é gerada, de modo que sua extração e análise manual torna-se demorada, repetitiva e trabalhosa. Esses problemas podem ser parcialmente resolvidos por um *software* que automatize algumas análises e aplique funções de processamento dos sinais. Sendo assim, o objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de um programa computacional que facilite o tratamento e análise dos dados obtidos a partir do método de VCVR.

## ABSTRACT

Dopamine (DA) is a neurotransmitter involved with the modulation of motor, behavioral and emotional functions. It also has influence in cognition and drug abuse. Alterations in the DA levels are also related to the development of different disorders, such as Parkinson's disease. DA releases in the synaptic cleft can occur in a tonic way (slow and with low levels of DA release, in the order of nM) or phasic (fast and with high levels of DA, in the order of  $\mu\text{M}$ ). In particular, the phasic release is determinant to many behaviors, such as decision making and reinforcement. Different methods were developed for the identification of changes in DA concentrations *in vivo*. Because of the high temporal resolution and selectivity, the fast scan cyclic voltammetry (FSCV) has been the most efficient technique for the identification and recording of the phasic release of DA. However, one of the main limitations of the methodology is the electric interference, once supersensitive electrodes are used for the recordings. Besides, the high temporal resolution of the FSCV generates a great amount of data that takes many hours of repetitive and slow manual analyses. This issue can be partially solved by a software that automates the analysis and applies signal processing functions that enhance the data quality. Then the goal of this project is the development of a software that facilitates the treatment and analyses of FSCV data.

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>6</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>10</b>
2.1 Objetivos gerais .....	10
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>11</b>
3.1 Dopamina .....	11
3.2 Voltametria cíclica de varredura rápida .....	13
<b>3.3 MATLAB .....</b>	<b>17</b>
<b>4. MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
4.1 Animais .....	17
4.2 Cirurgias .....	18
4.3 Voltametria cíclica de varredura rápida .....	19
4.4 Software para análise off-line dos dados de VCVR.....	20
<b>5. CRONOGRAMA .....</b>	<b>20</b>
<b>6. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>21</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A dopamina (DA) é um neurotransmissor que participa da modulação de funções motoras, comportamentais e emocionais (FRAURE *et al.*, 2008; BROMBERG-MARTIN *et al.*, 2010; DA CUNHA *et al.*, 2012). Além disso, patologias como a doença de Parkinson e a esquizofrenia apresentam níveis anormais e uma atividade incomum deste neurotransmissor no córtex cerebral e corpo estriado (HOWES *et al.*, 2012; DA CUNHA *et al.*, 2015; KRABBE *et al.*, 2015). A liberação deste neurotransmissor nos terminais sinápticos pode ocorrer de duas maneiras: de forma tônica, em que a DA é liberada lentamente e em quantidades baixas (da ordem de nanomolar, nM) nos terminais sinápticos, ou fásica, em que uma grande liberação (da ordem de micromolar,  $\mu\text{M}$ ) de curta duração ocorre (GRACE, 1995). Enquanto os efeitos comportamentais causados pela liberação tônica não são claros, muitos trabalhos identificaram a influência comportamental da liberação fásica (DA CUNHA *et al.*, 2015). Robinson e colaboradores (2002) observaram uma maior liberação fásica espontânea quando ratos machos eram introduzidos a outros ratos (machos e fêmeas), indicando uma relação entre a liberação fásica de DA e comportamentos apetitivos ou de aproximação. Este tipo de liberação também exerce um papel importante durante processos como a tomada de decisões, influenciando no comportamento de animais no momento de decidir por ações mais arriscadas ou com maior custo energético com o objetivo de alcançar maiores recompensas, por exemplo (SCHULTZ *et al.*, 2015). No caso de erros de predição – isto é, quando a recompensa recebida em consequência de uma ação não é igual à esperada –, a liberação fásica de DA ocorre de forma relativa ao erro, podendo aumentar em situações de reforço positivo (quando a recompensa é maior que a esperada) ou reduzir em casos de erro de predição negativo (quando a recompensa é menor que a esperada). Isto tem grande influência sobre o fortalecimento de redes neurais relativas a ação realizada, podendo influenciar na sua reincidência (SCHULTZ *et al.*, 2007). Por fim, também foi descrito uma correlação importante entre efeito das drogas de abuso sobre a liberação fásica (GRACE 1995; WANAT *et al.*, 2009). Drogas de abuso como anfetamina, cocaína, álcool e nicotina possuem efeitos diretos sobre este tipo de liberação, pois alteram diretamente a excitabilidade

dos neurônios dopaminérgicos ou interferem na recaptação do neurotransmissor. A maior excitabilidade facilita a ocorrência da liberação fásica e a inibição dos recaptadores geram um aumento de concentrações de DA na fenda sináptica, prolongando tempo de duração de seus efeitos (WANAT *et al.*, 2009). Além disso, verificou-se uma correlação entre este tipo de liberação e o comportamento de busca pela droga (PHILLIPS *et al.*, 2003), evidenciando ainda mais sua importante relação com a dependência de drogas.

Tendo em vista o impacto comportamental da liberação fásica, métodos que possibilitam a sua análise são ferramentas muito poderosas para estudos acerca da dependência de drogas de abuso, comportamento motor e tomada de decisões (CHEER *et al.*, 2004; SCHULTZ, 2007; DA CUNHA *et al.*, 2015; SCHULTZ *et al.*, 2015). A liberação tônica de DA pode ser medida pela técnica de microdiálise *in vivo*, na qual sondas feitas com membranas de microdiálise são implantadas no cérebro do animal. Neste processo, um líquido céfalo-raquidiano artificial é perfundido e amostras são coletadas em períodos de alguns minutos, separadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography* ou *High Performance Liquid Chromatography*) ou eletroforese capilar e quantificadas por detectores eletroquímicos ou de fluorescência (CHEFER *et al.*, 2009). A maior vantagem dessa técnica consiste na alta especificidade para a detecção da dopamina e de seus metabólitos. Porém, como a liberação fásica de DA é muito rápida, a técnica de microdiálise não tem resolução temporal suficiente para estudá-la. Métodos eletroquímicos, como a voltametria cíclica de varredura rápida (VCVR) e amperometria de potencial constante (APC), foram desenvolvidos para que essas variações pudessem ser registradas (JACKOWSKA e STRYSINKY, 2013). Ambas as técnicas consistem na aplicação de potenciais elétricos à microeletrodos, que induzem a oxidação e/ou redução das moléculas como DA, e no registro das alterações de corrente causadas por essas interações. Apesar da resolução temporal mais alta em comparação à VCVR, o método de APC apresenta uma seletividade menor. Como a amperometria aplica apenas um potencial elétrico fixo, esta técnica é capaz de identificar as variações de corrente apenas em um potencial durante o registro. Para identificar as variações de concentração de DA, o potencial aplicado é o mesmo em que as

moléculas de DA geralmente se oxidam; porém, outras substâncias que oxidam ou reduzem no mesmo potencial também podem ser registradas, impossibilitando uma identificação precisa da dopamina e sua diferenciação dos demais compostos detectados.

Diferentemente da APC, na técnica de VCVR são aplicados ciclos de variações de potenciais e todas as alterações de corrente nesses potenciais são registradas, o que permite identificar tanto a oxidação quanto a redução da molécula de DA. Além disso, a aplicação de uma análise de fator principal auxilia na distinção mais precisa da dopamina em relação às demais moléculas concomitantemente detectadas, aumentando a confiabilidade na identificação deste neurotransmissor. Devido à sua resolução temporal e seletividade, a técnica de VCVR é muito utilizada para medir alterações da concentração de DA em certas estruturas do cérebro (como o estriado e o núcleo accumbens) em que a quantidade de DA liberada é muito grande em comparação a outros neurotransmissores que geram um sinal eletroquímico muito semelhante ao da DA (DA CUNHA *et al.*, 2012).

Uma das principais limitações do método consistem na dificuldade de diferenciação de moléculas com pontos de oxi-redução muito semelhantes. Devido à semelhança entre as suas moléculas, a DA e a noradrenalina possuem pontos de oxi-redução parecidos, de modo que, em regiões onde as concentrações de DA são menores ou próximas às concentrações de noradrenalina, variações na concentração de ambas catecolaminas são detectadas, não sendo possível identificar qual das duas está variando. Outro empecilho consiste na grande sensibilidade elétrica do circuito, tornando o método susceptível a ruídos ou outros tipos de interferências que prejudicam a qualidade do sinal.

Por fim, devido à alta resolução temporal e como as todas alterações de corrente em todos os potenciais aplicados são registrados, a VCVR é uma técnica que gera uma quantidade de dados muito grande, o que dificulta a sua análise. Dependendo da duração do experimento, muita informação é gerada e a extração dos dados de alguns *softwares* disponíveis pode ser trabalhosa. Além disso, após a extração, alguns dados ainda precisam passar por etapas de normalização, tratamento de ruído, análise cinética, entre outras. Apesar da existência de um programa de acesso livre feito para as análises dos dados

(YORGASON, ESPANA e JONES, 2011), nem todos os aparelhos de VCVR geram arquivos compatíveis com o formato de arquivo que o programa exige.

O desenvolvimento de um *software* que facilite a análise dos dados gerados nos registros de VCVR é muito interessante, pois o tratamento e extração manual dos dados é demorada, repetitiva e trabalhosa e pode ser feita de maneira muito mais eficiente pelo computador. Sendo assim, o objetivo deste trabalho é desenvolver um *software* com uma interface gráfica intuitiva em que seja possível facilitar a extração de dados, realizar o tratamento de ruído de maneira eficiente, analisar a cinética dos neurotransmissores e automatizar a normalização dos dados. Por fim, este trabalho representa uma oportunidade para o desenvolvimento de uma forma mais rápida e padronizada de se analisar a grande quantidade de dados gerados pela técnica de VCVR.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivos gerais**

Este trabalho tem como objetivo principal o desenvolvimento de um *software* com uma interface gráfica intuitiva para a análise dos dados gerados durante os registros da técnica de voltametria cíclica de varredura rápida na linguagem de programação MATLAB (The MathWorks Inc., Natick, MA, 2016).

### **2.2 Objetivos específicos**

- Realizar o processamento dos dados de maneira que ruídos possam ser filtrados de maneira eficiente;
- Analisar a cinética do metabolismo dos neurotransmissores;
- Automatizar ao máximo a normalização dos dados.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Dopamina

A dopamina (3,4-dihidroxi-feniletanamina; DA) é um neurotransmissor com importante função modulatória sobre a aprendizagem, motivação, dependência de drogas de abuso, seleção de movimentos, entre outros (SCHULTZ *et al.*, 2007; BROMBERG-MARTIN *et al.*, 2010; REDGRAVE *et al.*, 2011; DA CUNHA *et al.*, 2015). A DA é uma catecolamina sintetizada em células específicas e age na ativação dos receptores dopaminérgicos (rDA) tipo-D1 e -D2 (RICHFIELD *et al.*, 1989; JACKOWSKA e KRYSINKI *et al.*, 2013). Receptores tipo-D1 possuem uma afinidade menor por este neurotransmissor em comparação aos tipo-D2, portanto espera-se que estes receptores necessitem de maiores quantidades de DA para sua ativação. Como a DA pode ser liberada de duas maneiras: de forma tônica (liberação mais lenta de concentrações baixas de DA) ou fásica (liberação mais rápida de altas concentrações de DA); enquanto a liberação tônica seria capaz de ativar os receptores tipo-D2, que são mais sensíveis, a liberação fásica ativaria ambos os tipos de receptores (GRACE, 1995; SCHULTZ *et al.*, 2015). A DA age como um modulador da atividade de sinapses glutamatérgicas, podendo facilitar ou dificultar a despolarização de um neurônio quando liberada de forma concomitante à liberação do neurotransmissor glutamato. Porém, a liberação de DA *per se*, não causa a despolarização de um neurônio; ela apenas modula a despolarização causada pela neurotransmissão glutamatérgica. Esta modulação ocorre porque ativação de rDA, que são ligados a proteínas  $G_s$  (rDA tipo-D1) e  $G_i/G_o$  (rDA tipo-D2), causam o aumento ou a redução de AMPc, respectivamente. O AMPc ativa a proteína cinase A (PKA), a qual fosforila receptores glutamatérgicos. Isso muda a condutividade desses receptores aos íons  $Na^+$  e  $Ca^{2+}$  e também pode mudar a afinidade desses receptores pelo glutamato (NEVE *et al.*; SVENNINGSSON *et al.*, 2004).

Os neurônios dopaminérgicos e suas projeções estão presentes em estruturas dos núcleos da base (NB). Esses núcleos estão relacionados com funções de aprendizado, comportamento motor, motivação, entre outras (RICE *et al.*, 2011). Duas estruturas dos NB, a área tegmental ventral (ATV) e a

substância negra compacta (SNc) são constituídas por um grande número de neurônios dopaminérgicos (BJORKLUND e DUNNETT, 2007). As projeções dos neurônios dopaminérgicos da ATV terminam em estruturas do sistema límbico (núcleo accumbens, hipocampo e amígdala) e no córtex pré-frontal. Estas vias são conhecidas como mesolímbica e mesocortical, respectivamente, e estão relacionadas principalmente a comportamentos motivacionais e emocionais (FRAURE *et al.*, 2008; BROMBERG-MARTIN e HIKOSAKA, 2009). Já a via formada pelas projeções da SNc para o estriado, denominada via nigro-estriatal, participa da seleção de ações motoras por meio da modulação do circuito neural que envolve a via direta e indireta (ROBERTSON e ROBERTSON, 2008, DA CUNHA *et al.*, 2012).

Nos terminais sinápticos a DA é armazenada em vesículas sinápticas que são transportadas pelo transportador vesicular de monoaminas (MVT, do inglês *Monoamine Vesicular Transporter*). Quando o neurônio pré-sináptico é despolarizado, a DA acumulada nas vesículas sinápticas é liberada por exocitose no terminal sináptico. A liberação da dopamina é proporcional à frequência de potenciais de ação que chegam aos terminais sinápticos. Os neurônios dopaminérgicos apresentam dois padrões de ativação distintos: a ativação tônica e fásica. A ativação tônica é mais longa e é caracterizada por uma frequência de disparo de mais baixa enquanto a ativação fásica é de curta duração possui uma frequência muito mais alta (GRACE, 1995; BROMBERG-MARTIN *et al.*, 2010; BASS *et al.*, 2013). Enquanto a ativação tônica resulta em concentrações de DA na fenda sináptica inferiores a 40-50 nM, durante a ativação fásica as concentrações extracelulares de DA chegam a unidades de micromolar (CHURCH *et al.*, 1987; RICE *et al.*, 2011; DA CUNHA *et al.*, 2015). Diferentemente da liberação tônica, em que seus efeitos comportamentais são pouco claros, a liberação fásica de DA possui grande impacto sobre a aprendizagem e a motivação para expressar respostas aprendidas (DA CUNHA *et al.*, 2015). Isso porque a liberação fásica de dopamina é proporcional ao que o indivíduo espera receber como consequência de um comportamento e o que ele realmente recebe. Essa diferença é chamada de erro de predição. Se ela é alta, a concentração de DA pode ser suficiente para a ativação dos rDA do tipo D1. Isso deflagra mecanismos de plasticidade sináptica que reforçam as sinapses entre os neurônios que estão ativos em

resposta a um estímulo condicionado e os neurônios que, quando estão ativos, deflagram a resposta que ocasionou a recompensa maior que o esperado (GRACE, 1995; SCHULTZ, 2007; SCHULTZ *et al.*, 2015).

Após ser liberada na fenda sináptica, a DA é recaptada pelo transportador da DA (DAT, do inglês *dopamine transporter*) e metabolizada dentro dos neurônios por enzimas como a monoamina oxidase (MAO) e a catecolamina ortometiltransferase (COMT) (Figura 1). Esses mecanismos são responsáveis pela cinética do neurotransmissor e são importantes para a reciclagem da DA liberada, respectivamente (MEISER *et al.*, 2013). Drogas como anfetamina e cocaína inibem a atividade dos transportadores, interferindo na recaptação da DA nos terminais sinápticos (SEIDEN *et al.*, 1993; CARBONI *et al.*, 2001).

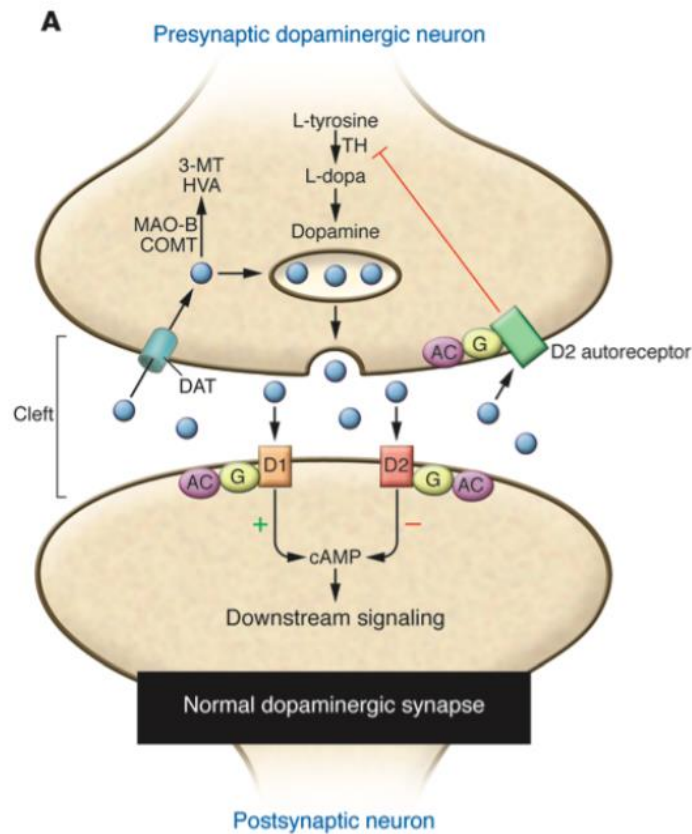


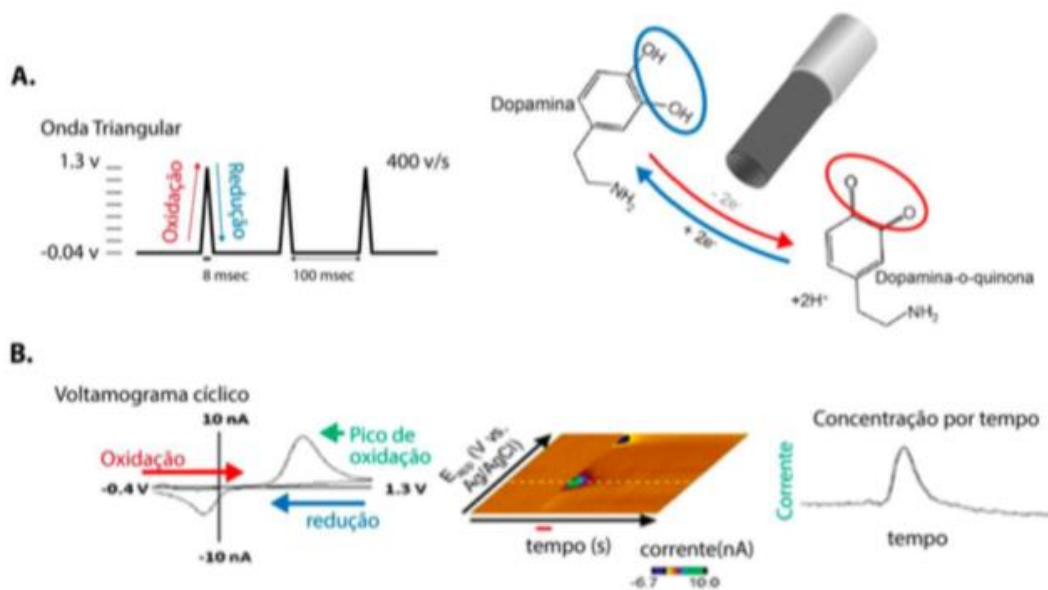
Figura 1. Sinapse dopaminérgica. Fonte: BLACKSTONE, 2009

### 3.2 Voltametria cíclica de varredura rápida

A voltametria cíclica de varredura rápida é uma técnica em que é possível realizar medidas de variação na concentração de neurotransmissores,

como a DA no meio extracelular, em intervalos curtos de tempo (GARRIS *et al.*, 1997; WIGHTMAN, 2006). O método oferece uma resolução temporal e espacial muito alta (décimos de segundo) em comparação à técnica de microdiálise (minutos a horas), outro método de análise de concentrações de neurotransmissores (ROBINSON, HEIEN e WIGHTMAN, 2002; JACKOWSKA e KRYSINSKI, 2013). Essa característica da voltametria permite que ela seja usada para estudos da cinética de liberação e recaptção (YORGASON, ESPANA e JONES, 2011).

Para identificar variações nas concentrações relativas de DA, o método aplica repetidamente ciclos de variações de potenciais elétricos a um eletrodo de fibra de carbono (Figura 2A) e registra a corrente elétrica resultante da oxidação ou redução dos analitos no eletrodo. Esse registro é feito por um potenciostato. Como as moléculas da DA oxidam e reduzem quando certos potenciais elétricos são aplicados à fibra, nos momentos em que o ciclo de variação atinge estes pontos a alteração na corrente causada pela doação ou recuperação dos elétrons é registrada. O gráfico que mostra a variação da corrente elétrica em função do potencial elétrico a cada ciclo é chamado de voltamograma. Um voltammograma cíclico pode ser considerado como a assinatura química de um analito; O voltamograma da DA é mostrado na Figura 2B. Após a calibração do eletrodo com concentrações conhecidas de DA é possível calcular pela intensidade da corrente no pico de oxidação qual foi a variação de sua concentração. (BUCHER e WIGHTMAN, 2015).



**Figura 2. Voltametria cíclica de varredura rápida.** A) Ciclos de varredura de potenciais elétricos são aplicadas ao eletrodo de registro, o que faz com que a dopamina se oxide na fase ascendente da varredura e que o seu produto de oxidação se reduza a dopamina na fase descendente da varredura. Os elétrons gerados pela dopamina durante a oxidação são doados para o eletrodo e devolvidos durante a redução. B) As correntes registradas pelos eletrodos estão representadas em 3 tipos de gráfico. O voltamograma cíclico da oxirredução da dopamina mostra seus potenciais ótimos de oxidação (valores positivos) e de redução (valores negativos). Os dados de todos os voltamogramas (10 voltamogramas a cada segundo) são representados em um *colorplot* onde o tempo é representado no eixo do x, a variação de potencial elétrico a cada ciclo é representada no eixo do y e as correntes de oxidação/redução são representadas por cores. Os pontos verde e preto desse *colorplot* mostram a oxidação e redução da dopamina, respectivamente. A variação de corrente no potencial ótimo de oxidação da dopamina ao longo do tempo (linha pontilhada do gráfico central em B) é mostrada no gráfico de linha à direita. Fonte: Robinson & Wightman (2007).

Devido à velocidade em que os potenciais são aplicados (os ciclos são repetidos 10 vezes a cada segundo) a técnica de VCVR é ideal para se observar atividade fásica do neurotransmissor. Isto também possibilita o

monitoramento em tempo real das variações na concentração de DA durante experimentos *in vitro* e *in vivo*, em animais anestesiados e *freely moving* (JACKOWSKA e KRYSINSKI, 2013). Essa resolução temporal é muito valiosa, pois o papel da DA durante diversos comportamentos pode ser inferido pela correlação temporal entre a concentração relativa de DA e o comportamento observado (CHEER *et al.*, 2004; ROBINSON e WIGHTMAN, 2007). Além disso, estudos sobre a atividade de fármacos sobre o transporte da DA podem ser feitos, pois a cinética do neurotransmissor também pode ser avaliada (YORGASON, ESPANA e JONES, 2011). O tamanho dos eletrodos utilizados na VCVR, que possuem menos de 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro e cerca de 100  $\mu\text{m}$  de comprimento, é outra vantagem da técnica em comparação ao método de microdiálise, pois o dano tecidual é bem menor.

Entretanto, uma desvantagem da técnica é que suas medições não consistem em concentrações absolutas de neurotransmissores. Como a técnica registra as correntes geradas por outros compostos (por exemplo, oxigênio, outros neurotransmissores e alterações de pH) presentes na região em que o eletrodo é posicionado, para que a análise da variação de DA possa ser realizada, uma subtração digital de dois momentos é feita (ANASTASSIOU *et al.*, 2006; KITA e WIGHTMAN, 2008; BUCHER *et al.*, 2013). Para isolar a corrente gerada apenas pela oxi-redução da dopamina subtrai-se o voltamograma cíclico registrado em um tempo X pelo voltamograma registrado a um tempo X-y. O resultado só é reproduzível se o intervalo de tempo não for superior a 3 segundos. Após a subtração desses valores, é obtida a variação de corrente relativa às alterações de concentração de substâncias entre os dois tempos, inclusive a do neurotransmissor (HERMANS *et al.*, 2008). Como pode haver uma liberação de outros compostos junto à DA, mesmo com a subtração esses valores de corrente podem estar contaminados com as correntes de oxi-redução da liberação física de outros neurotransmissores. Para que as variações de concentração de outros neurotransmissores não sejam confundidas com variações de DA, é necessário realizar uma análise de fator principal a fim de separar que informações são relativas a cada molécula.

Os dados salvos durante os registros armazenam as informações relativas à variação de corrente durante a alternância dos potenciais. Uma vez que os dados são obtidos a partir de sinais elétricos, a presença de ruídos é

comum. Os ruídos constituem as interferências exteriores de diversas fontes como, por exemplo, estática e frequências emitidas por aparelhos elétricos. Além disso, como muitos estudos de VCVR utilizam pulsos elétricos para estimular a liberação de DA em certas regiões, por consequência alguns sinais podem ser captados pelos eletrodos, gerando ruídos que podem comprometer a qualidade dos dados e interferir nas análises.

### **3.3 MATLAB**

O MATLAB (The MathWorks Inc., Natick, MA, 2016) possui uma ampla aplicação em ciências biológicas e, principalmente, na engenharia, a linguagem já possui incontáveis programas pré-estabelecidos que facilitam o desenvolvimento de novos *softwares*. Pacotes de funções dentro da plataforma voltados ao processamento de sinais estão disponíveis. Dado que todas as informações registradas pela técnica de VCVR são sinais elétricos, a disponibilidade desses programas facilita o tratamento e análise dos dados. O MATLAB também pode ser considerado uma linguagem menos complexa quando comparado a outras plataformas, o que facilita o seu uso por pessoas que não possuem uma formação específica nas áreas de ciências da computação.

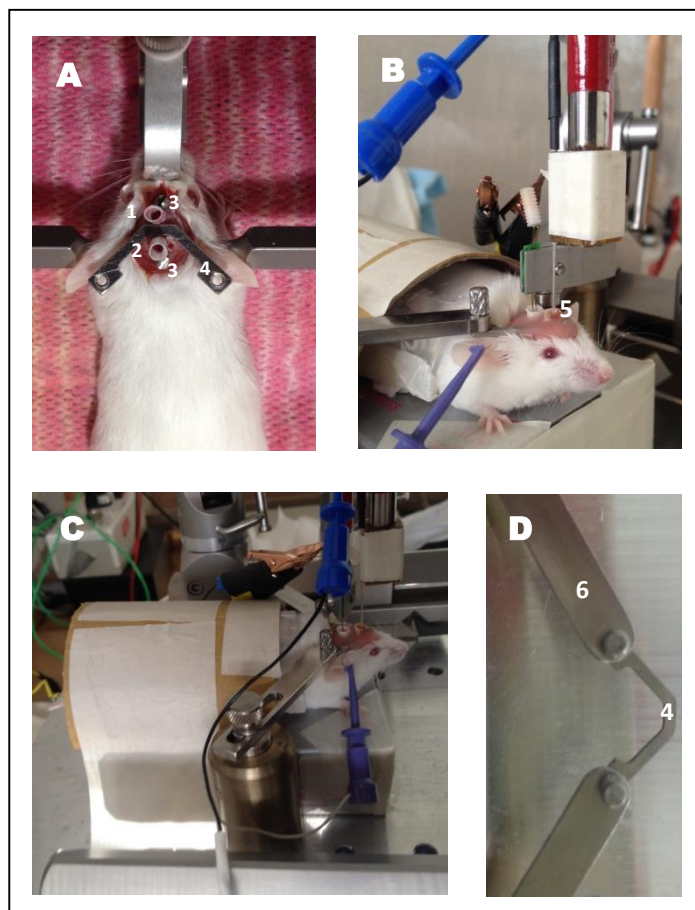
## **4. MÉTODOS**

### **4.1 Animais**

Camundongos *Swiss* machos adultos albinos (20-40 g) da colônia da Universidade Federal do Paraná serão utilizados neste estudo. Os animais serão alojados em grupos de 5 em caixas de polipropileno (41x34x16 cm) com cepilho sob ciclos claro/escuro de 12 h/12 h (luzes acesas às 7 da manhã) e temperatura controlada ( $22 \pm 2$  °C). Água e comida estarão disponíveis *ad libitum*. Após as cirurgias, os animais serão alojados individualmente. Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Paraná (protocolo número 638).

## 4.2 Cirurgias

Cada camundongo receberá doses de ibuprofeno (15 mg/kg v. o.) e sulfato de atropina (0.04 mg/kg s.c.) e será anestesiado com isoflurano 2%, via inalatória. Em seguida, os animais serão fixados ao aparelho estereotáxico (*David Kopf Instruments*, Tujunga, CA). A temperatura corporal será mantida a 37-38°C por uma manta térmica. A fixação do *frame* e das cânulas para o implante dos eletrodos de estimulação e registros será feita da seguinte maneira: Para a exposição e limpeza da superfície do crânio, será utilizado um bisturi e algodão esterilizado. Uma broca (*David Kopf Instruments*) será utilizada para realizar a abertura de 2 orifícios de 2 mm de diâmetro no crânio, para o futuro implante dos eletrodos. De acordo com as coordenadas estereotáxicas baseadas no Atlas de Paxinos e Franklin (2005), os orifícios serão feitos acima da região do NAc (AP +1.5 mm, ML +0.8 mm) e ATV (AP - 3.5 mm, ML +0.5 mm) para o implante do eletrodo de registro e estimulação, respectivamente. Cilindros plásticos (3 mm de diâmetro, 7 mm de altura e 1mm de espessura) serão colocados acima das aberturas para mantê-los expostos para o futuro implante (Figura 3A). Outros três orifícios serão feitos, dois deles para fixação dois parafusos (que ajudarão a manter o capacete do camundongo mais fixo ao crânio) e um para a inserção de um fio de Ag/Cl (prata clorada), que servirá como eletrodo de referência (onde a corrente medida é considerada igual a zero). O *frame*, uma peça de aço inoxidável em forma de V, será posicionado entre as cânulas (Figura 3A). Por fim, tudo será fixado ao crânio com cimento dental. As cânulas serão preenchidas com antibiótico em gel para evitar a exposição do tecido e infecções.



**Figura 3** Cirurgia e registro de VCVR. A) Posicionamento das cânulas (3) e do frame (4). 1 e 2 indicam a posição em que os parafusos serão colocados. B) Camundongo fixado à plataforma pelo frame (4) preso ao crânio. Eletrodo de registro (5) posicionado para o implante. C) Animal restringido. D) Suporte da plataforma (6) em que o animal é fixado pelo frame (4).

### 4.3 Voltametria cíclica de varredura rápida

Para os registros de VCVR, os camundongos serão fixados pelo *frame* de seus capacetes à uma plataforma adaptada (Figura 3D). Após a fixação, o corpo do animal será restringido ao máximo para evitar a sua movimentação durante o registro (Figura 3C). Em seguida, para iniciar os registros, o antibiótico em gel será removido e os eletrodos serão posicionados sob as cânulas. Os eletrodos de estimulação e registro serão introduzidos ao cérebro seguindo as coordenadas das estruturas ATV (DV 3.9 - 4.1 mm abaixo da dura máter) e NAc (DV 3.3 - 4.0 mm), respectivamente (Figura 2b). Microeletrodos de fibra de carbono isolados por vidro com pontas de 7  $\mu\text{m}$  de diâmetro e 70-90

um de comprimento serão utilizados como eletrodos de registro. Um *Wireless Instantaneous Neurotransmitters Concentration System* (WINCS, Mayo Clinic, Rochester, MN) será usado para o registro de VCVR. Os dados serão transmitidos por *bluetooth* a um computador gerenciado pelo *software WINCSware with MINCS* (versão 2.10.4.0, Mayo Clinic). As estimulações elétricas realizadas para evocar a liberação de DA no NAc serão programadas pelo *Mayo Investigational Neuromodulation Control System* (MINCS, Mayo Clinic).

#### 4.4 Software para análise off-line dos dados de VCVR

O desenvolvimento do *software* será na linguagem de programação MATLAB (The MathWorks Inc., Natick, MA, 2016). As funções de processamento de sinais já desenvolvidas dentro da plataforma serão utilizadas para o tratamento dos dados.

### 5. CRONOGRAMA

Atividade	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun
Levantamento bibliográfico	X	X	X	X	X	X
Desenvolvimento do software	X	X	X			
Experimentos Head-fixed	X	X				
Análises de dados		X	X	X	X	
Redação do TCC				X	X	X
Defesa do TCC						X

## 6. REFERÊNCIAS

ANASTASSIOU, COSTAS A.; PATEL, BHAVIK A.; ARUNDELL, MARTIN; YEOMAN, MARK S.; PARKER, KIM H.; O'HARE, DANNY. Subsecond voltammetric separation between dopamine and serotonin in the presence of ascorbate. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 19, p. 6990–6998, 2006.

BASS, C. E.; GRINEVICH, V. P.; GIOIA, D.; et al. Optogenetic stimulation of VTA dopamine neurons reveals that tonic but not phasic patterns of dopamine transmission reduce ethanol self-administration. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 7, n. November, p. 173, 2013.

BROMBERG-MARTIN, E. S.; HIKOSAKA, O. Midbrain dopamine neurons signal preference for advance information about upcoming rewards. **Neuron**, v. 63, n. 1, p. 119–26, 2009. Elsevier Ltd.

BROMBERG-MARTIN, E. S.; MATSUMOTO, M.; HIKOSAKA, O. Dopamine in Motivational Control: Rewarding, Aversive, and Alerting. **Neuron**, v. 68, n. 5, p. 815–834, 2010. Elsevier Inc.

BUCHER, E. S.; WIGHTMAN, R. M. Electrochemical Analysis of Neurotransmitters. **Annual review of analytical chemistry** (Palo Alto, Calif.), v. 8, p. 239–61, 2015.

BUCHER, E. S.; BROOKS, K.; VERBER, M. D.; et al. Flexible software platform for fast-scan cyclic voltammetry data acquisition and analysis. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 21, p. 10344–10353, 2013.

CARBONI, E; SPIELEWOY, C; VACCA, C; NOSTEN-BERTRAND, M; GIROS, B; DI CHIARA, G. Cocaine and amphetamine increase extracellular dopamine in the nucleus accumbens of mice lacking the dopamine transporter gene. **J Neurosci**, v. 21, n. 9, p. RC141: 1-4, 2001.

CHEER, J. F.; WASSUM, K. M.; HEIEN, M. L. A. V. M.; et al. Cannabinoids Enhance Subsecond Dopamine Release in the Nucleus Accumbens of Awake Rats. **J. Neurosci.**, v. 24, n. 18, p. 4393–4400, 2004.

CHEFER, V. I.; THOMPSON, A. C.; ZAPATA, A.; SHIPPENBERG, T. S. Overview of brain microdialysis. **Current Protocols in Neuroscience**, 2009.

CHURCH, W. H.; JUSTICE, J. B.; NEILL, D. B. Detecting behaviorally relevant changes in extracellular dopamine with microdialysis. **Brain Research**, v. 412, n. 2, p. 397–399, 1987.

DA CUNHA, C.; BOSCHEN, S. L.; GÓMEZ-A, A.; et al. Toward sophisticated basal ganglia neuromodulation: Review on basal ganglia deep brain stimulation. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 58, p. 186–210, 2015. Elsevier Ltd.

DA CUNHA, C.; GOMEZ-A, A.; BLAHA, C. D. The role of the basal ganglia in motivated Behaviour. **Reviews in the Neurosciences**, v. 23, n. 5–6, p. 747–767, 2012.

DA CUNHA, C.; WIETZIKOSKI, E. C.; DOMBROWSKI, P.; et al. Learning processing in the basal ganglia: A mosaic of broken mirrors. **Behavioural Brain Research**, v. 199, n. 1, p. 157–170, 2009.

FAURE, A.; REYNOLDS, S. M.; RICHARD, J. M.; BERRIDGE, K. C. Mesolimbic dopamine in desire and dread: enabling motivation to be generated by localized glutamate disruptions in nucleus accumbens. **J. Neuroscience**, v. 28, n. 28, p. 7184–7192, 2008.

GARRIS, P. A.; CHRISTENSEN, J. R.; REBEC, G. V; WIGHTMAN, R. M. Real-time measurement of electrically evoked extracellular dopamine in the striatum of freely moving rats. **Journal of Neurochemistry**, v. 68, n. 1, p. 152–161, 1997.

GRACE, A. A. The tonic/phasic model of dopamine system regulation: its relevance for understanding how stimulant abuse can alter basal ganglia function. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 37, n. 2, p. 111–129, 1995.

HERMANS, A.; KEITHLEY, R. B.; KITA, J. M.; SOMBERS, L. A.; WIGHTMAN, R. M. Dopamine detection with fast-scan cyclic voltammetry used with analog background subtraction. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 11, p. 4040–4048, 2008.

HOWES, O. D.; KAMBEITZ, J.; KIM, E.; STAHL, D.; SLIFSTEIN, M. The nature of dopamine dysfunction in schizophrenia and what this means for treatment. **Archives of General Psychiatry**, v. 69, n. 8, p. 776–786, 2013.

JACKOWSKA, K.; KRYSINSKI, P. New trends in the electrochemical sensing of dopamine. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 11, p. 3753–3771, 2013.

KRABBE, S.; DUDA, J.; SCHIEMANN, J.; et al. Increased dopamine D2 receptor activity in the striatum alters the firing pattern of dopamine neurons in the ventral tegmental area. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 12, p. E1498-506, 2015.

MEISER, J.; WEINDL, D.; HILLER, K. Complexity of dopamine metabolism. **Cell communication and signaling**, v. 11, n. 1, p. 34, 2013.

PAXINOS, G., and FRANKLIN, K. B. J. (2005) The mouse brain in stereotaxic coordinates. Compact Second ed.; Academic press: San Diego

PHILLIPS, P. E.; STUBER, G. D.; HEIEN, M. L.; WIGHTMAN, R. M.; CARELLI, R. M. Subsecond dopamine release promotes cocaine seeking. **Nature**, v. 422, n. 6932, p. 614–618, 2003

REDGRAVE, P.; VAUTRELLE, N.; REYNOLDS, J. N. J. Functional properties of the basal ganglia's re-entrant loop architecture: Selection and reinforcement. **Neuroscience**, v. 198, p. 138–151, 2011. Elsevier Inc.

RICHFIELD, E. K.; PENNEY, J. B.; YOUNG, A. B. Anatomical and affinity state comparisons between dopamine D1 and D2 receptors in the rat central nervous system. **Neuroscience**, v. 30, n. 3, p. 767–777, 1989.

ROBERTSON, G. S.; ROBERTSON, H. A. Evidence that L-dopa-induced rotational behavior is dependent on both striatal and nigral mechanisms. **J. Neuroscience**, v. 9, n. 9, p. 3326–3331, 1989.

ROBINSON, D. L.; HEIEN, M. L. A V; WIGHTMAN, R. M. Frequency of dopamine concentration transients increases in dorsal and ventral striatum of male rats during introduction of conspecifics. **J. neuroscience**, v. 22, n. 23, p. 10477–10486, 2002.

ROBINSON, D. L.; WIGHTMAN, R. M. Nomifensine amplifies subsecond dopamine signals in the ventral striatum of freely-moving rats. **Journal of Neurochemistry**, v. 90, n. 4, p. 894–903, 2004.

ROITMAN, M. F.; STUBER, G. D.; PHILLIPS, P. E. M.; WIGHTMAN, R. M.; CARELLI, R. M. Dopamine operates as a subsecond modulator of food seeking. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 24, n. 6, p. 1265–1271, 2004.

SCHULTZ, W. Behavioral dopamine signals. **Trends in Neurosciences**, v. 30, n. 5, p. 203–210, 2007.

SCHULTZ, W.; CARELLI, R. M.; WIGHTMAN, R. M. Phasic dopamine signals: From subjective reward value to formal economic utility. **Current Opinion in Behavioral Sciences**, v. 5, p. 147–154, 2015. Elsevier Ltd.

SCHULTZ, W.; DAYAN, P.; MONTAGUE, P. R. A Neural Substrate of Prediction and Reward. **Science**, v. 275, n. 5306, p. 1593–1599, 1997.

SEIDEN, L. S.; SABOL, K. E.; RICAURTE, G. A. Amphetamine: effects on catecholamine systems and behavior. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 33, p. 639–677, 1993.

SVENNINGSSON, P.; NISHI, A.; FISONE, G.; et al. DARPP-32: an integrator of neurotransmission. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 44, p. 269–296, 2004.

UNDIEH, A. S. Pharmacology of signaling induced by dopamine D1-like receptor activation. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 128, n. 1, p. 37–60, 2010. Elsevier Inc.

WANAT, M. J.; WILLUHN, I.; CLARK, J. J.; PHILLIPS, P. E. M. Phasic dopamine release in appetitive behaviors and drug addiction. **Current drug abuse reviews**, v. 2, n. 2, p. 195–213, 2009.

WIGHTMAN, R. M. Probing Cellular Chemistry in Biological Systems with Microelectrodes. **Science**, v. 311, n. 5767, p. 1570–1574, 2006.

YORGASON, J. T.; ESPAÑA, R. A.; JONES, S. R. Demon Voltammetry and Analysis software: Analysis of cocaine-induced alterations in dopamine signaling using multiple kinetic measures. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 202, n. 2, p. 158–164, 2011.