

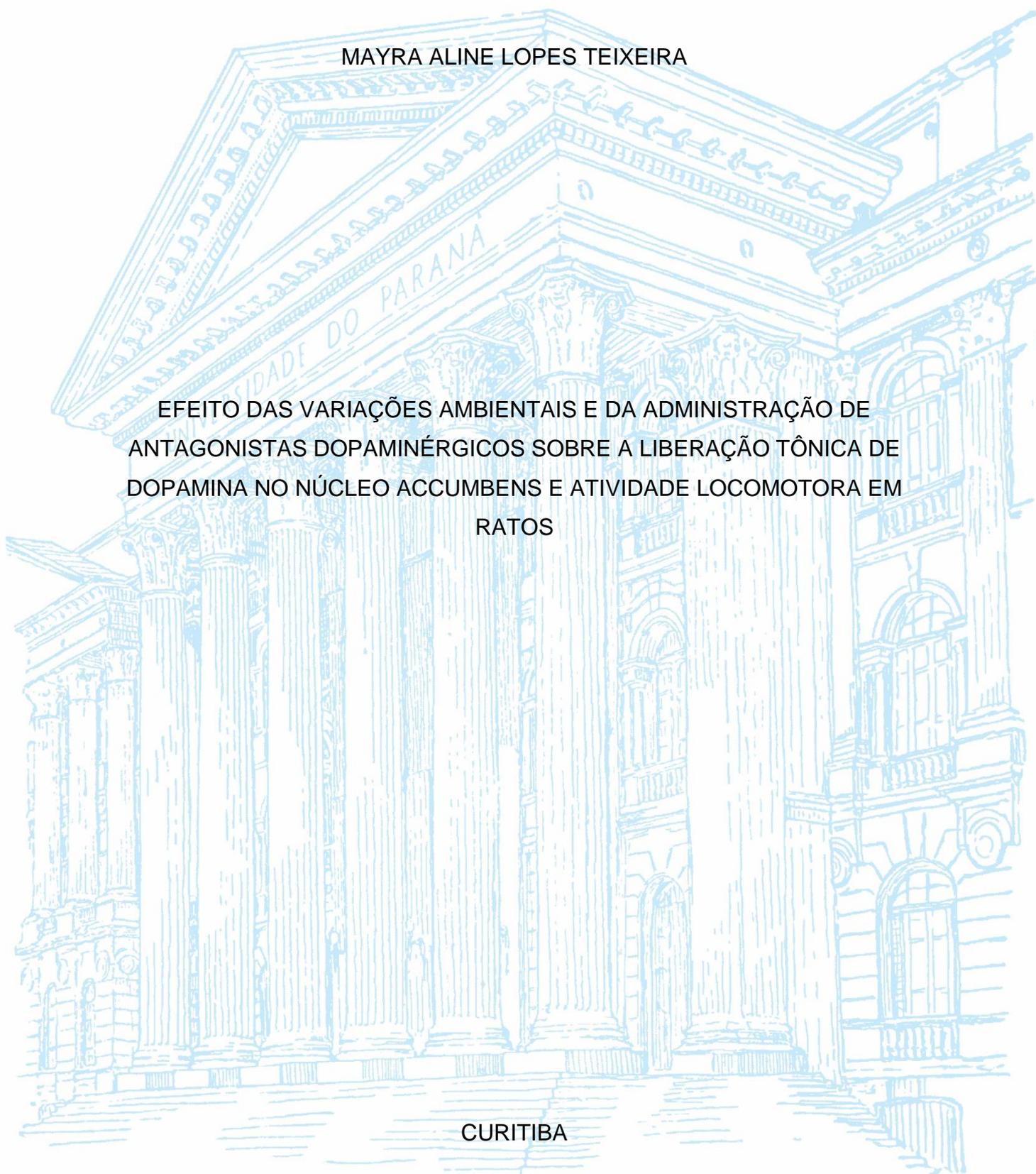
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MAYRA ALINE LOPES TEIXEIRA

EFEITO DAS VARIAÇÕES AMBIENTAIS E DA ADMINISTRAÇÃO DE
ANTAGONISTAS DOPAMINÉRGICOS SOBRE A LIBERAÇÃO TÔNICA DE
DOPAMINA NO NÚCLEO ACCUMBENS E ATIVIDADE LOCOMOTORA EM
RATOS

CURITIBA

2019



MAYRA ALINE LOPES TEIXEIRA

EFEITO DAS VARIAÇÕES AMBIENTAIS E DA ADMINISTRAÇÃO DE
ANTAGONISTAS DOPAMINÉRGICOS SOBRE A LIBERAÇÃO TÔNICA DE
DOPAMINA NO NÚCLEO ACCUMBENS E ATIVIDADE LOCOMOTORA EM
RATOS

Monografia apresentada à disciplina Estágio Supervisionado em Biologia (BIO028), como requisito parcial à conclusão da modalidade de Bacharelado do Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Claudio da Cunha
Coorientador: José Augusto Pochapski

CURITIBA

2019

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Maria e Theodoro, que sem medir esforços me ajudaram chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que sempre acreditaram em mim, agradeço todo apoio e amor, sem vocês nada disso seria possível. A bondade e humildade de vocês me inspira e me faz querer ser melhor. Agradeço por serem meu porto seguro.

Ao Alexander, agradeço por me apoiar e me incentivar nos momentos de ansiedade, por sua paciência e amor.

Ao meu orientador, Cláudio da Cunha, pela oportunidade de ser sua aluna e por todos os seus ensinamentos.

Ao meu coorientador, José Augusto, que tornou-se um grande amigo com quem pude dividir os momentos de dificuldade. Agradeço por dividir comigo toda a responsabilidade, serei eternamente grata pelo seu apoio.

Ao João Lucas, agradeço pelo companheirismo e parceria nos experimentos e pela sua dedicação ao projeto.

Ao William, pela grande ajuda nas análises de dados e pelos ensinamentos com voltametria, isso me ajudará muito no futuro.

A Laura e Julie, que me acolheram com tanto carinho quando comecei a iniciação científica no laboratório e me ensinaram tudo que sabiam com muita paciência.

Ao pessoal do laboratório, cada um ajudou muito para que o ambiente de trabalho fosse leve.

Aos membros da banca, por aceitarem avaliar o meu trabalho.

À CNPq e *Albert Einstein College of Medicine* pelo apoio financeiro.

“I am among those who think that science has great beauty.”

Marie Curie

RESUMO

Estudos demonstram que o núcleo accumbens (NAc) está associado à seleção de respostas comportamentais a estímulos ambientais e a atividade locomotora. Ambas ações estão ligadas aos níveis de liberação de dopamina (DA). Desta forma, este trabalho busca investigar se alterações de contexto são capazes de modificar os níveis de liberação tônica de DA no NAc e a possível correlação com aumento da atividade locomotora, tal como o efeito do bloqueio de receptores D1 e D2 sobre estas respostas comportamentais. Para o estudo utilizamos 15 ratos Wistar machos adultos. Inicialmente, os animais foram submetidos a 9 sessões de habituação onde utilizamos 2 diferentes contextos. Em seguida foi realizado o procedimento de cirurgia estereotáxica para implante de uma cânula-guia posicionada acima do NAc. Após um período de 7 dias de recuperação, mais 10 sessões de re-habituação foram realizadas, seguidas de uma sessão de teste. Na sessão de teste os animais foram previamente divididos em 3 grupos experimentais onde estes receberam a administração de salina, haloperidol ou SCH23390. Durante a sessão de teste os animais foram posicionados no contexto A tendo a membrana de microdiálise posicionada no NAc e perfundida com líquido cefalorraquidiano artificial. Amostras foram coletadas a cada 10 minutos. Durante 90 minutos amostras das concentrações basais de DA foram coletadas. Após esse período foi realizada a administração de salina, SCH23390 ou haloperidol seguido de 30 minutos adicionais no contexto A. Ao final desse período os animais foram transferidos ao contexto B e mantidos neste por um período de 2 horas, sendo que após 1 hora de exposição ao contexto B os animais foram gentilmente manuseados (30 segundos). Toda a sessão de teste foi gravada para a realização de posteriores análises comportamentais. A concentração de DA nas amostras de dialisado foram analisadas por cromatografia líquida de alta resolução. A administração de haloperidol provocou aumento da concentração de DA após a mudança de contexto e manipulação, assim como a locomoção, e diminuiu o tempo de mobilidade. Assim, os resultados sugerem que a liberação tônica de DA após variações ambientais está relacionada com receptores dopaminérgicos do tipo D2. Entretanto adicionais experimentos são necessários.

Palavras-chave: Dopamina. Microdiálise. Atividade locomotora.

ABSTRACT

Studies show that the Nucleus Accumbens (NAc) is associated with the selection of behavioral responses to environmental stimuli and arousal levels. Both actions are connected to the dopamine (DA) release levels. The aims of the present study is to investigate whether contextual changes are capable of modifying the tonic release levels of DA in the NAc and the possible correlation with the increased locomotor activity, also the effects of D1 and D2 receptor antagonists on these behavioral responses. For the study we used 15 adult male Wistar rats. Initially the animals were submitted to 9 habituation sessions to 2 different contexts. Subsequently, a stereotactic surgery procedure was performed to implant a guide cannula in the NAc. After the recover, 10 more sessions of habituation were performed, followed by a test session. In the test session the animals were previously divided into 3 experimental groups (Salina, Haloperidol or SCH23390). Initially the animals were placed in context A having the microdialysis membrane positionated in the NAc and perfused with artificial cerebrospinal fluid. Samples were collected every 10 minutes. During 90 minutes samples of DA basal concentrations were collected. After this period saline, SCH23390 or haloperidol was administered, followed by an additional 30 minutes in context A. At the end of this period the animals were transferred to context B and kept there for 2 hours, and after 1 hour of exposure to context B the animals were gently handled (30 seconds). The entire test session was recorded for further behavioral analysis. The DA concentration in dialysate samples were analyzed by high resolution liquid chromatography. Haloperidol administration increased the concentration of DA after changing context and manipulation, as well as locomotion, and decreased mobility time. Thus, the results suggest that the tonic release of DA after environmental variations is related to D2 dopaminergic receptors. However additional experiments are needed.

Key Words: Dopamine. Microdialysis. Arousal.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - SINAPSE DOPAMINÉRGICA E METABOLISMO DA DOPAMINA.....	12
FIGURA 2 - ILUSTRAÇÃO DE REGISTROS DA ATIVAÇÃO FÁSICA OU TÔNICA DOS NEURÔNIOS DOPAMINÉRGICOS.....	13
FIGURA 3 - EXEMPLO ILUSTRATIVO DE UMA SONDA DE MICRODIÁLISE.....	15
FIGURA 4 - RECIPIENTE UTILIZADO COMO CONTEXTO A.....	19
FIGURA 5 - RECIPIENTE UTILIZADO COMO CONTEXTO B.....	19
FIGURA 6 - CAIXA DE HABITUAÇÃO ONDE AMBOS CONTEXTOS A E B FORAM POSICIONADOS.....	19
FIGURA 7 - CÂNULA-GUIA INSERIDA NO NÚCLEO ACCUMBENS.....	21
FIGURA 8 - SONDA DE MICRODIÁLISE.....	23
FIGURA 9 - PROCESSO DE DIFUSÃO QUE OCORRE DURANTE A TÉCNICA DE MICRODIÁLISE.....	24
FIGURA 10 - VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE DOPAMINA NOS DIFERENTES GRUPOS.....	27
FIGURA 11 - MÉDIA DE VARIAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE DOPAMINA NOS DIFERENTES GRUPOS.....	28
FIGURA 12 - MÉDIA DE VARIAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE DOPAMINA APÓS VARIAÇÕES AMBIENTAIS.....	28
FIGURA 13 - MÉDIA DE VARIAÇÃO NA LOCOMOÇÃO NOS DIFERENTES GRUPOS.....	29
FIGURA 14 - MÉDIA DE VARIAÇÃO NA MOBILIDADE NOS DIFERENTES GRUPOS.....	30

LISTA DE SIGLAS

AD - Aldeído desidrogenase

AMPC- Monofosfato de adenosina cíclica

COMT - Catecol ortometiltransferase

DA – Dopamina

DAT - *Dopamine transporter*

FSCV - Voltametria cíclica de varredura rápida (do inglês *fast-scan cyclic voltammetry*)

HPLC - Cromatografia líquida de alta resolução (do inglês *high precision liquid chromatography*)

MAO - Monoamina oxidase

NAc - Núcleo accumbens

SNC - Substância *nigra* compacta

TH - Tirosina hidroxilase

VMAT - Transportador vesicular de dopamina (do inglês *vesicular monoamine transporter*)

VTA - Área tegmental ventral (do inglês *ventral tegmental area*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
1.1 NEUROTRANSMISSÃO DOPAMINÉRGICA.....	11
1.2 TÉCNICAS DE MONITORAMENTO DE DOPAMINA.....	13
1.3 DOPAMINA, NÚCLEO ACCUMBENS E LOCOMOÇÃO	16
1.4 OBJETIVOS	17
1.4.1 Objetivo Geral	17
1.4.2 Objetivos Específicos	17
2 METODOLOGIA	18
2.1 ANIMAIS.....	18
2.2 PROTOCOLO DE HABITUAÇÃO.....	18
2.3 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA	20
2.4 SESSÃO DE TESTE	21
2.5 MICRODIÁLISE.....	23
2.6 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTO DESEMPENHO (HPLC).....	24
2.7 HISTOLOGIA	24
2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
3 RESULTADOS PARCIAIS	26
4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

1.1 NEUROTRANSMISSÃO DOPAMINÉRGICA

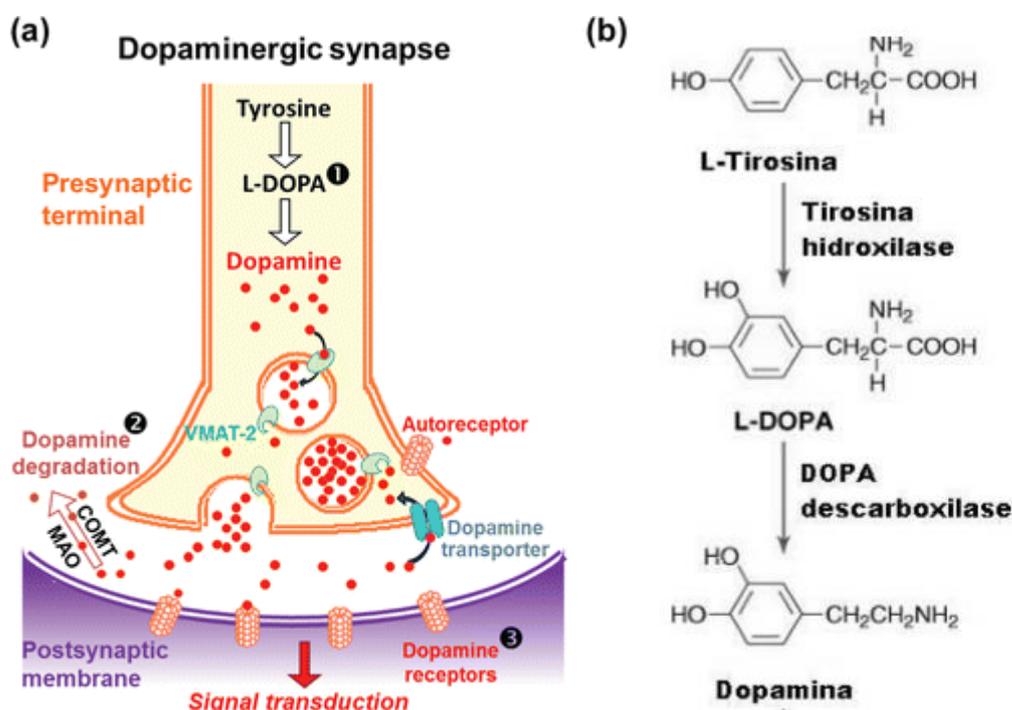
A dopamina (DA) é um neurotransmissor cuja atividade é amplamente descrita por contribuir na regulação de processos de controle da atividade motora, funções cognitivas como o aprendizado associativo, comportamento motivado, entre outras funções essenciais para a nossa sobrevivência (COSTA *et al.*, 2006; IKEMOTO *et al.*, 2005; DA CUNHA *et al.*, 2012). Haja vista a importante função exercida pela DA em uma ampla gama de comportamentos, alterações nos padrões de atividade dopaminérgica estão diretamente relacionados à ocorrência de quadros patológicos, tais como doença de Parkinson (DELONG *et al.*, 2007; FRISINA *et al.*, 2009; TRITSCH, 2012; CALABRESI, 2014), esquizofrenia (CARLSSON *et al.*, 2004), transtorno bipolar (COUSINS *et al.*, 2009), transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (DEL CAMPO *et al.*, 2011), transtorno obsessivo compulsivo (CALABRESI, 2014) e com o abuso de drogas (WANAT *et al.*, 2009).

Quanto a neurotransmissão dopaminérgica, os neurônios dopaminérgicos possuem seus corpos celulares localizados majoritariamente na área tegmental ventral (VTA) e na substância *nigra* compacta (SNc), estes neurônios ao projetar seus axônios para áreas corticais e subcorticais formam três importantes vias de projeção: via mesocortical, via mesolímbica e via nigroestriatal (IKEMOTO, 2007; IKEMOTO *et al.*, 2005).

Em relação a DA, esta é uma monoamina da família das catecolaminas (JACKOWSKA *et al.*, 2013), a sua síntese, tal como apresentado na figura 1, ocorre a partir do aminoácido precursor tirosina, a qual pela ação da enzima tirosina hidroxilase (TH) é convertida em L-DOPA (3,4-diidroxifenilalanina) esta, na etapa seguinte de síntese, é convertida a DA pela enzima DOPA descarboxilase. Após este processo, a DA é transportada para as vesículas sinápticas através da ação do transportador vesicular de dopamina (VMAT, *vesicular monoamine transporter*) para que posteriormente possa ser liberada por exocitose na ocorrência da despolarização do terminal sináptico dopaminérgico (JONES *et al.*, 2014). A quantidade de DA liberada na fenda sináptica depende da intensidade do estímulo apresentado e da sua capacidade preditiva, tal como da saliência motivacional associada a ocorrência

do estímulo em questão (GRACE, 2000). Após a sua liberação, a molécula de DA pode se ligar aos receptores dopaminérgicos, ser recaptada (onde por ação do transportador de DA, DAT - *dopamine transporter*, as moléculas de DA podem ser transportadas novamente para os terminais pré-sinápticos) ou sofrer metabolização enzimática pela ação da monoamina oxidase (MAO) ou pela ação da catecol ortometiltransferase (COMT) (BJORKLUND & DUNNETT, 2007).

FIGURA 1. Sinapse dopaminérgica e processo de metabolismo da DA. A-B. (a) Processo de síntese da DA e posterior transferência desta as vesículas sinápticas pelo transportador de monoamina vesicular 2 (VMAT-2). Na ocorrência do processo de sinalização dopaminérgica está presente a etapa de exocitose das vesículas contendo DA, após isto a DA poderá se ligar aos receptores dopaminérgicos presentes na membrana pós-sináptica, podendo modular assim a atividade do neurônio pós-sináptico. A DA pode então ser reciclada através da recaptação via ação do DAT, ou metabolizada pela ação da das enzimas monoamina oxidase (MAO) ou pela enzima catecol-O-metiltransferase (COMT). (b) No terminal pré-sináptico de neurônios dopaminérgicos, o aminoácido tirosina pode ser convertido a L-DOPA pela ação da enzima tirosina hidroxilase. A L-DOPA é posteriormente convertida a DA pela ação da enzima DOPA descarboxilase.



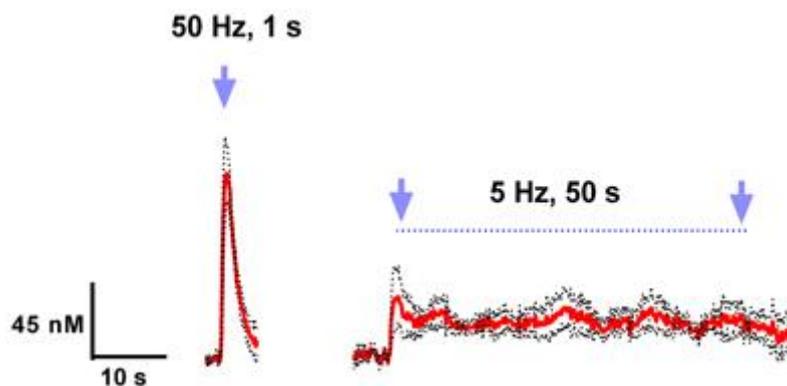
FONTE: JONES *et al* (2014)

Quanto aos receptores dopaminérgicos, estes são classificados como receptores metabotrópicos, ou seja, são acoplados a proteína G e podem ser divididos em duas famílias: D1 e D2. Dentro da família D1 estão presentes os receptores do tipo D1 e D5, nos quais após a ligação da DA a estes receptores há a estimulação da formação de AMPc (monofosfato de adenosina cíclica), tendo então

estes receptores atividade excitatória. Já em relação a família D2, esta compreende aos receptores do tipo D2, D3 e D4, cuja ativação pela DA leva a inibição da formação de AMPc, tendo assim atividade inibitória (MISSALE *et al.*, 1998). Além das diferenças quanto ao tipo de proteína G associada a estes receptores, estas famílias diferem quanto a afinidade que apresentam em relação a ligação das moléculas de DA. Receptores da família D2 podem apresentar uma afinidade à DA até 10 vezes maior que receptores da família D1 (ESTEVINHO *et al.*, 2003).

Quanto a liberação de DA, esta pode ocorrer de duas maneiras distintas: tônica e fásica, tal como representado na figura 2. Quanto a liberação tônica de DA, esta ocorre na forma de ocorrência de potenciais de ação de baixa frequência onde a DA é liberada de forma lenta, porém constante, onde há a liberação de pequenas quantidades de DA, ocorrendo esta em uma escala temporal de minutos. Já em relação a liberação fásica de DA, há a ocorrência de uma alta frequência de potenciais de ação, onde de maneira rápida, em uma escala de milissegundos, uma grande quantidade de DA é liberada na fenda sináptica (ROBINSON & WIGHTMAN, 2007).

FIGURA 2. Ilustração de registros da ativação fásica (esq.) ou tônica (dir.) dos neurônios dopaminérgicos.



FONTE: BASS *et al* (2013)

1.2 TÉCNICAS DE MONITORAMENTO DE DOPAMINA

Buscando uma melhor compreensão dos processos que envolvem a liberação fásica e tônica de DA, técnicas de monitoramento da concentração extracelular de DA, tais como registros da liberação de DA via voltametria cíclica de

varredura rápida (FSCV - *fast-scan cyclic voltammetry*) ou microdiálise podem ser empregadas.

A FSCV é uma técnica geralmente utilizada para monitoramento de alterações rápidas nas concentrações extracelulares de DA. Esta técnica possui uma excelente resolução temporal, registrando alterações nos níveis de DA em uma escala de milissegundos. Nesta técnica, a partir da utilização de microeletrodos de fibra de carbono (possuindo entre 5 a 30 μm de diâmetro), realiza-se o implante destes na região de interesse através de um procedimento de cirurgia estereotáxica, permitindo assim a posterior detecção da liberação fásica de DA nesta estrutura de interesse (GARRIS, *et al.*, 2002).

Quanto a técnica de microdiálise, esta não possui uma resolução temporal tão precisa quanto a FSCV, apresentando uma resolução temporal na escala de minutos, entretanto, em contrapartida a microdiálise permite um excelente limiar de detecção dos níveis de DA, estes podendo estar em uma escala femtomolar (MOGHADDAM *et al.*, 1990), isto tendo de 2 a 3 vezes a magnitude do limite de detecção do permitido pela FSCV (WESTERINK *et al.*, 1991), sendo assim mais adequada para a análise de padrões de liberação tônica de DA.

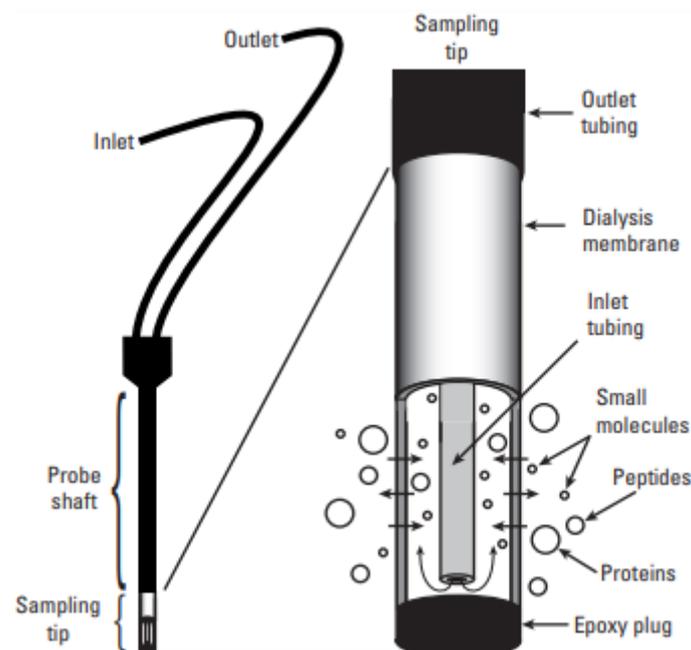
A aplicação da técnica de microdiálise não se restringe ao monitoramento da liberação de DA, sendo possível também o monitoramento de outros neurotransmissores e respectivos metabólitos. Os primeiros estudos que avaliaram a liberação de transmissores em animais anestesiados ou em movimento livre empregavam a técnica *push-pull* desenvolvida por Gaddum (1961) e Myers (1972), a qual não utilizava uma sonda específica para tal, promovendo também elevados danos teciduais durante a execução do processo. Somente em 1974 Ungerstedt e colegas implementaram o uso da sonda de microdiálise, havendo assim um aumento da eficiência e da qualidade de coleta das amostras (UNGERSTEDT e PYCOCK, 1974; UNGERSTEDT *et al.*, 1982). Graças a estas melhorias promovidas por Ungerstedt e colaboradores houve uma significativa disseminação do uso deste método para a quantificação de neurotransmissores, metabólitos, etc. Desde então mais de 11.000 trabalhos foram publicados utilizando a técnica de microdiálise em diversos âmbitos da neurociência (CHEFER *et al.*, 2009)

O processo de microdiálise é descrito pela primeira lei de difusão de Fick, o que significa que as substâncias passam pela membrana ao longo de seu gradiente de concentração por difusão passiva (BONGAERTS *et al.*, 2018), de uma região de

maior concentração para uma região de menor concentração. A sonda de microdiálise contém uma membrana semipermeável, que permite passagem da solução extracelular e posterior coleta deste dialisato ao longo de um determinado tempo (figura 3). Em função da seletividade que as membranas apresentam apenas solutos de baixo peso molecular serão capazes de penetrar a membrana para serem então coletados, assim, a concentração de dialisato coletado representará somente uma fração da concentração real existente no líquido extracelular (CHEFER *et al.*, 2009).

Em experimentos usando a técnica de microdiálise uma sonda é implantada na região de interesse no tecido cerebral, onde, durante o experimento, esta é constantemente perfundida com uma solução fisiológica, a qual apresenta a composição semelhante a do líquido extracelular do tecido cerebral (BONGAERTS *et al.*, 2018). Quanto a taxa de perfusão desta solução, geralmente são utilizadas taxas de perfusão que variam entre 0,3 a 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ (CHEFER *et al.*, 2009).

FIGURA 3. Sonda de microdiálise. Durante o experimento é utilizada uma solução que possui composição iônica semelhante à do fluido extracelular do cérebro, sendo esta bombeada para a entrada da sonda, passando assim pela área ativa da membrana de microdiálise, onde ocorrerá o contato com o conteúdo extracelular presente, após isto o conteúdo coletado flui pela saída da sonda. À medida que a solução perfunde a membrana de microdiálise, há a geração de um gradiente de concentração através da membrana, possibilitando a difusão de moléculas de interesse presentes no meio extracelular através da membrana. A extremidade da sonda, onde está localizada a membrana de microdiálise geralmente possui entre 200–400 μm de diâmetro e 2 mm de comprimento.



FONTE: Watson *et al* (2013)

Desta forma, a técnica de microdialise possui duas principais vantagens quanto ao monitoramento dos níveis de DA: elevada sensibilidade e especificidade química. Isto ocorre pelo fato que após o dialisado ser coletado do tecido cerebral, este pode ser analisado por uma variedade de técnicas de separação química, como por exemplo a técnica de cromatografia líquida de alta performance, gerando assim uma excelente resolução e sensibilidade química, permitindo a identificação eficaz de DA mesmo a níveis bem baixos de concentração (JUSTICE, 1993).

1.3 DOPAMINA, NÚCLEO ACCUMBENS E LOCOMOÇÃO

Em meados da década de 80 Mogenson e colaboradores apresentaram a proposta de que o núcleo accumbens (NAc) seria o local de conexão entre o sistema motor e o sistema límbico (MOGENSEN *et al.* 1980). Esta proposta foi baseada no fato do NAc receber projeções de neurônios dopaminérgicos da VTA, projeções oriundas da amígdala, hipocampo e córtex pré-frontal. Isto também é reforçado pelo fato que quando DA era injetada diretamente no NAc observava-se um aumento na atividade locomotora (JONES e MOGENSEN, 1980). Esta proposta é suportada por experimentos inúmeros experimentos posteriores, onde a ativação dos receptores de dopaminérgicos no NAc promoveram um aumento da locomoção, e lesões realizadas no NAc promoviam uma inibição da locomoção, isto ocorrendo mesmo após a administração de anfetamina, droga classicamente conhecida por promover aumento na atividade locomotora, entre outros efeitos (KELLY *et al.* 1975).

Um outro conceito relacionado aos efeitos na ativação locomotora promovida pela dopamina é quanto ao estado de *arousal*. Este é definido como uma função primitiva no sistema nervoso de vertebrados responsável pela ativação inicial de todas as respostas comportamentais, em resposta a estímulos ambientais (PFAFF, 2006).

É descrito que a partir de informações sensoriais frente a determinados estímulos ambientais levariam ao início de respostas comportamentais apropriadas frente a estes estímulos específicos, isto promoveria um estado de ativação de um estado de *arousal* generalizado, o que levaria a atividade motora, maior capacidade de resposta sensorial e maior capacidade de processamento emocional. Assim, por exemplo, um indivíduo num elevado estado de *arousal* estaria mais ativo motoramente, mais suscetível a estímulos sensoriais e emocionais (PFAFF, 2006). A ausência desses elementos contribui para a modulação dos estados de consciência

(GIACINO *et al.*, 2014, LAUREYS e SCHIFF, 2012), da mesma forma que a sua presença excessiva resulta em transtornos de ansiedade (RESSLER e MAYBERG, 2007).

Desta forma, neste trabalho buscamos avaliar o papel da liberação tônica de DA no NAc em relação a atividade locomotora, marcador dos estados de *arousal*. Como previamente descrito, os receptores dopaminérgicos possuem diferentes níveis de afinidade, tendo os receptores da família D1 menor afinidade, havendo assim a necessidade de níveis mais elevados de DA para a ativação deste, isto ocorrendo a partir da atividade fásica dos neurônios dopaminérgicos. Enquanto os receptores da família D2 possuem uma alta afinidade tendo maior probabilidade de serem ativados durante a liberação tônica de DA (RICHFIELD *et al.*, 1989). Deste modo estas populações de receptores podem ser diferencialmente ativadas conforme o padrão de liberação de DA, modulando estados de atividade motora e *arousal*. Assim sendo, buscamos avaliar neste trabalho um possível papel da ativação de receptores dopaminérgicos da família D1 ou D2 sobre a atividade motora evocada por alterações contextuais em que estes animais foram expostos.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo principal investigar os efeitos da alteração de contextos ambiental em relação a um possível aumento do estado de *arousal* em ratos, relacionando isto com os níveis tônicos de liberação de DA no NAc. Tal como se estas alterações nos níveis de DA poderiam promover aumento na atividade locomotora destes animais (a qual seria um indicador do estado de *arousal*).

1.4.2 Objetivos Específicos

- Padronizar o uso da técnica de microdiálise para uso em animais acordados.
- Avaliar possíveis alterações nos níveis de liberação de DA no NAc de ratos após variações de contextos ambientais e manipulação destes animais.
- Avaliar de que forma os receptores D1 e D2 estariam envolvidos na expressão do comportamento de *arousal* através da administração de antagonistas de receptores D1 ou D2, SCH23390 e haloperidol, respectivamente.

2 METODOLOGIA

2.1 ANIMAIS

Utilizamos neste experimento até o presente momento 15 ratos Wistar machos adultos (estima-se que até o final do experimento sejam utilizados 30 animais no total, com a representação de 10 animais por grupo) com peso inicial de 220 a 250 gramas provenientes do biotério central do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram mantidos no biotério em ambiente com temperatura e luminosidade controlada ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$ e ciclo claro/escuro de 12 horas, começando às 7:00 horas) e acesso a água e comida *ad libitum*. Os procedimentos experimentais foram realizados entre as 10h e as 17h. Todos os protocolos experimentais estão de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, e foram aprovados previamente pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Paraná, sob o CEUA nº 23075.041021/2019-25.

2.2 PROTOCOLO DE HABITUAÇÃO

Inicialmente com intuito de habituação dos animais aos experimentadores, durante 2 dias consecutivos os animais foram gentilmente manuseados por um período de 10 minutos. Durante este período os animais foram retirados de suas caixas de moradia e procedimentos de transporte até o aparato de teste, contenção e manuseio foram simulados. Adicionais 9 sessões de habituação foram realizadas com o objetivo de habituar o animal aos aparatos utilizados na tarefa comportamental, tal como ao procedimento experimental.

A tarefa comportamental consistiu na exposição do animal a dois diferentes contextos (A e B). O contexto A consiste em um recipiente cilíndrico com fundo revestido em plástico (figura 4) e o recipiente utilizado como contexto B consiste em uma caixa retangular com o fundo revestido de areia (figura 5). Ambos os contextos ficaram posicionados dentro de uma caixa de madeira e fórmica (figura 6), a qual tem por objetivo atenuar influências sonoras e visuais do ambiente externo. Durante este período de habituação, os animais foram gentilmente posicionados, inicialmente no contexto A, e mantidos neste por 30 minutos. Após este período, os animais foram

gentilmente contidos para a realização de uma injeção de solução salina 0,9% (0,1 ml, via i.p ou s.c), com intuito de habituar os animais a este procedimento de injeção, atenuando o estresse promovido por este procedimento no dia de teste. Posteriormente a injeção os animais foram removidos do contexto A para que este pudesse ser substituído pelo contexto B, onde os animais foram posicionados e mantidos durante adicionais 30 minutos. Após as sessões de habituação terem sido realizadas os animais foram submetidos a cirurgia estereotáxica (descrita abaixo).

Figura 4. Ilustração do recipiente utilizado como contexto A.



FONTE: Autor

Figura 5. Ilustração Recipiente utilizado como contexto B.



FONTE: Autor

Figura 6. Ilustração da caixa de habituação. Os recipientes do contexto A e B ficaram posicionados dentro de uma caixa fechada, para atenuar ruído ou interferência externa.



FONTE: Autor

A realização de um longo período de habituação é essencial para este experimento, pois o animal deve estar bem habituado ao experimentador, contextos e procedimentos (injeção, transporte, manuseio, etc.) da mesma forma o uso de uma caixa de madeira e fórmica que é mantida fechada durante todo o experimento faz com que influências externas (sons, alterações de luminosidade, etc) sejam evitadas, fazendo assim com que possíveis alterações nos níveis tônicos de dopamina e alterações da atividade locomotora sejam específicos as manipulações realizadas (mudança de contexto, administração de fármacos e estimulação do animal, descritas abaixo na sessão de teste).

2.3 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

A cirurgia estereotáxica foi realizada objetivando-se o implante unilateral de uma cânula guia no NAc para a posterior realização da técnica de microdiálise. Para o procedimento cirúrgico os animais foram anestesiados com quetamina (75mg/kg i.p) e xilazina (10 mg/kg i.p) e posicionados em aparelho estereotáxico (David Kopf Instruments, Tajunga, EUA) através do conduto auditivo. Após o posicionamento do animal no estereotáxico foi realizada a administração de penicilina procaína (0,1 ml i.m). Logo acima da região do crânio onde foi realizada a incisão foi efetuada a administração de lidocaína (0,5 ml s.c.) e após 5 minutos da administração o escalpo dos animais foi cortado com um bisturi para a exposição do crânio e visualização do bregma. Após a visualização do bregma foram utilizadas as coordenadas provenientes do Atlas de Anatomia Cerebral de Ratos de Paxinos e Watson (2007) para a localização das estruturas cerebrais pretendidas, onde a cânula-guia (figura 7) foi implantada acima do NAc, com as seguintes coordenadas: anterior-posterior +2.0mm, medial-lateral +1,5 mm e dorsal-ventral -6,0 mm.

Figura 7. Cânula-guia inserida no núcleo accumbens



FONTE: BaSi S.A.

Em seguida três parafusos foram fixados no crânio dos animais com intuito de promover suporte e fixação ao implante, seguido da adição de acrílico dental para a formação de um capacete recobrendo a porção do crânio exposta. Logo após a cirurgia e nos três próximos dias foi realizada a administração de ibuprofeno (10 mg/kg, v.o.), tal como a realização da pesagem dos animais para averiguar possíveis problemas com a recuperação pós cirúrgica.

2.4 SESSÃO DE TESTE

Após a execução da cirurgia estereotáxica para o implante de uma cânula guia para o posterior posicionamento de uma sonda de microdiálise no NAc e do período de recuperação desta cirurgia (7 dias), 10 adicionais sessões de re-habituação foram realizadas de maneira similar a forma descrita acima, com uma pequena alteração, neste procedimento de habituação após a cirurgia há o uso de um sistema de contenção (*tether*) preso ao pescoço do animal, com o objetivo de habituar o animal ao sistema de microdiálise que foi utilizado no dia de experimento. Tendo completado o período de habituação uma sessão de teste foi realizada.

Previamente a sessão de teste os animais foram divididos em 3 grupos experimentais:

- Controle, onde foi realizada a administração de solução salina 0,9% (s.c.) (n=7)
- Grupo antagonista D1, onde foi realizada a administração de SCH23390 (40ug/kg s.c. n=4)

- Grupo antagonista D2, onde foi realizada a administração de haloperidol (150ug/kg i.p. n=4).

Nesta sessão de teste, previamente ao posicionamento do animal no contexto A uma sonda de microdiálise (procedimento descrito na seção abaixo) foi cuidadosamente conectada à cânula guia que fora previamente implantada, sendo então a membrana da sonda posicionada no NAc. Esta membrana foi perfundida com líquido cefalorraquidiano artificial (145 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,0 mM MgCl₂; 1,2 mM CaCl₂) a uma velocidade de 1,7 ul/minuto, sendo que coletas do dialisado foram realizadas a cada 10 minutos durante todo o experimento. Após isto, o animal foi posicionado no contexto A e durante 90 minutos amostras referentes a atividade basal foram coletadas. Tendo as amostras basais sido coletadas foi realizada a administração de solução salina, haloperidol ou SCH23390 (nos respectivos grupos experimentais) e os animais foram mantidos por um período adicional de 30 minutos no contexto A e ao final deste período foi realizada a mudança do animal em teste para o contexto B. Neste procedimento, o animal foi gentilmente contido enquanto o aparato utilizado como contexto A era substituído pelo referente ao contexto B. Uma vez posicionado no contexto B o animal foi mantido neste por um total de 2 horas, sendo que após estar uma hora neste contexto B foi realizada uma breve manipulação do animal (o qual foi gentilmente manuseado por um período de 30 segundos) e novamente posicionado no contexto B para o período remanescente de 1 hora. Esta manipulação tem por objetivo promover um estado de estimulação ao animal. Ao final de um período total de 4 horas (2 horas no contexto A e 2 horas no contexto B), os animais foram removidos do aparato de teste e novamente alocados em suas caixas de moradia até a realização do procedimento de eutanásia para a coleta do cérebro para a realização dos procedimentos de histologia para a confirmação do posicionamento da membrana de microdiálise. Durante a sessão de teste um total de 24 amostras de dialisado foram coletadas, tal como a realização de registro de vídeo durante toda a sessão. As amostras coletadas foram analisadas por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC, do inglês *high precision liquid chromatography*) para verificação dos níveis de DA. Os vídeos registrados foram analisados pelo software EthoVision (Noldus, USA), onde parâmetros de locomoção e estado de atividade motora foram analisados.

2.5 MICRODIÁLISE

No dia do teste uma sonda de microdiálise foi introduzida no NAc via cânula-guia. A sonda de microdiálise utilizada contém uma membrana semipermeável de 2 mm de comprimento e 320 μm de diâmetro, que foi diretamente exposta no tecido alvo (figura 8).

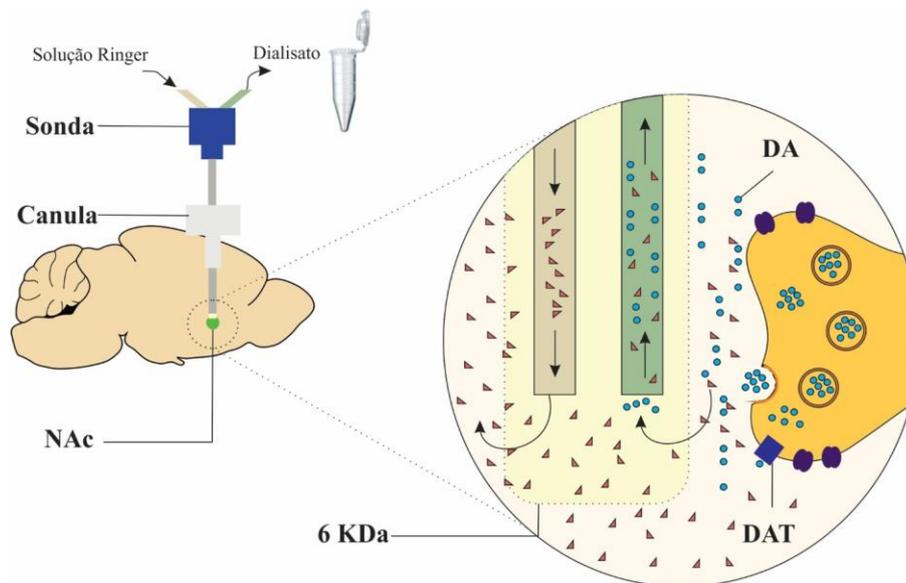
Figura 8. Sonda de microdiálise foi introduzida na cânula-guia para o teste de microdiálise.



Fonte: BaSi S.A.

A membrana (figura 9) foi conectada a um sistema de entrada e saída, sendo o sistema de entrada constantemente perfundido com líquido cefalorraquidiano artificial a uma velocidade de 1,7 $\mu\text{l}/\text{minuto}$, permitindo assim o processo de difusão tal como previamente realizado em nosso laboratório (GOMEZ-A, A *et al.* 2017). Durante o presente experimento amostras do dialisado foram coletadas a cada 10 minutos, em um total de 24 amostras por animal. As amostras de dialisado foram coletadas e mantidas em recipientes contendo solução de 3 μl de ácido perclórico (0,1 M) e 0,06% de metabissulfito de sódio (para minimizar a degradação), protegidas da luz e armazenadas a temperatura de -80°C até a realização das análises de quantificação por HPLC.

Figura 9. Processo de difusão que ocorre durante a técnica de microdiálise.



FONTE: Autor.

2.6 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTO DESEMPENHO (HPLC)

A análise neuroquímica dos níveis de DA presentes nas diferentes amostras de dialisado coletadas durante a sessão de microdiálise foi realizada por HPLC. Este é um método físico-químico o qual permite a separação e quantificação de compostos presentes em vários tipos de amostras, com alto poder de detecção, resolução e eficiência. Essa técnica possui uma fase estacionária, que permite o empacotamento de micropartículas de cerca de 3-10 μm , e uma fase móvel, que circula sob alta pressão ao longo da coluna com um fluxo controlado, tornando a análise da amostra mais rápida e eficaz, desta forma permitindo a detecção dos níveis de DA e outros neurotransmissores presentes nas amostras analisadas (MOITA *et al.* 2015).

2.7 HISTOLOGIA

Após o término dos experimentos comportamentais, os animais foram eutanasiados por sobredose de pentobarbital (25mg/kg). Os cérebros foram removidos e armazenados em solução fixadora até serem seccionados em fatias de 40 μm em vibrátomo. O controle histológico para a determinação do posicionamento da cânula-guia foi realizado a partir da realização do método de Nissl (Tionina 0,25%,

Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) para posterior localização do posicionamento da cânula-guia. Para a confirmação do correto posicionamento da cânula guia no NAc foi realizada a inspeção das lâminas sob um microscópio óptico (Leica, USA) com auxílio do atlas de Paxinos e Watson (2007).

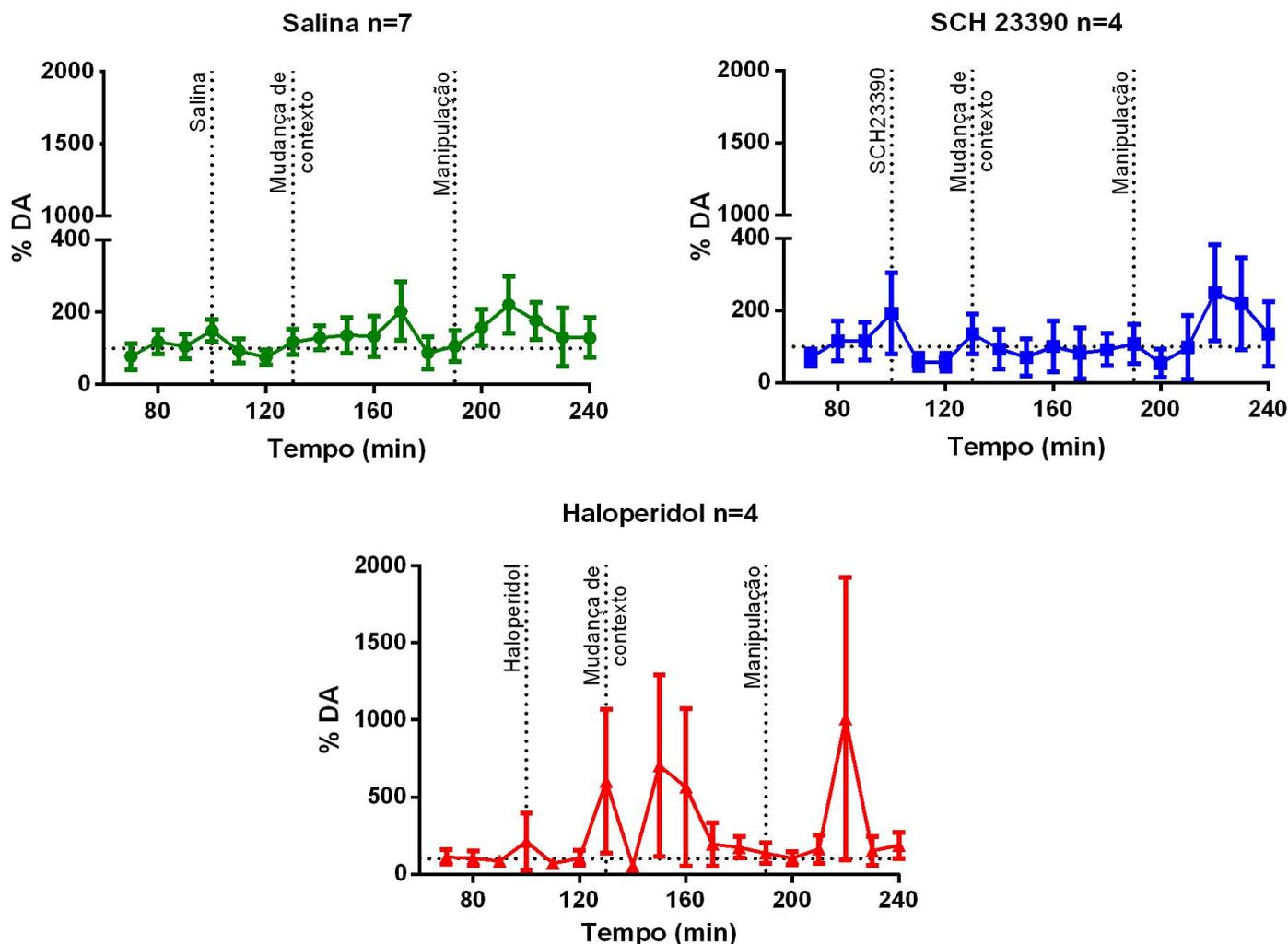
2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas usando o GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). Inicialmente os dados correspondentes aos picos de detecção de DA foram normalizados em relação a baseline (3 últimas amostras coletadas durante a primeira hora do animal no contexto A). Após isto foi os dados foram transformados em valores de z-score devido a elevada variabilidade da amostra, buscando assim uma melhor representação dos resultados. Para a obtenção de uma melhor representação das alterações nos níveis de DA no decorrer do experimento foi realizada a obtenção dos valores referentes ao delta, calculado a partir da subtração entre os maiores versus os menores valores referentes aos picos de DA nas janelas de análise de interesse, levando em consideração a ordem de ocorrência destes. Os dados foram analisados através da análise de variância (ANOVA) de duas vias. A significância foi estabelecida em um valor de $p < 0,05$ e os dados são apresentados como as médias \pm SEMs.

3 RESULTADOS PARCIAIS

Os resultados a serem apresentados representam dados parciais previamente coletados. Primeiramente buscamos observar possíveis alterações nos níveis de DA em relação a eventos específicos, tais como a realização do procedimento de injeção (administração de solução salina, SCH23390 ou haloperidol), em relação a mudança de contexto (contexto A para o contexto B e após a manipulação do animal por 30 segundos, após este ter permanecido no contexto B por 1 hora). As figuras 10 e 11 representam valores de z-score referentes as alterações nos níveis de DA nos 3 diferentes grupos experimentais no decorrer das 4 horas de coleta. Após análise de ANOVA de 2 vias não observamos diferenças estatísticas ($p > 0.05$) quanto as alterações nos níveis de DA nos diferentes grupos experimentais e eventos de interesse. Entretanto de maneira descritiva pudemos observar que inicialmente após a realização do procedimento de administração, seja ela solução salina, SCH23390 ou haloperidol, não observamos grandes variações nas concentrações de DA (figuras 10 e 11), que permaneceu próxima a sua concentração basal. A mudança de contexto foi capaz de provocar aumento de até 162%, 94% e 533% na concentração de DA nos grupos administrados com solução salina, SCH 23390 e haloperidol, respectivamente. A breve manipulação do animal causou aumento dos níveis de DA no período de 1 hora após este, havendo aumento nos picos de até 185% na concentração de DA em animais que receberam solução salina, 259% em animais que receberam SCH 23390 e 806% em animais que receberam haloperidol.

Figura 10. Efeito da administração de solução salina 0,9% (n=7), SCH 23390 (n=4) e haloperidol (n=4), variação ambiental e manipulação animal sob a concentração de DA. Dados representando as alterações em cada um dos 3 grupos experimentais. Os dados foram inicialmente normalizados em percentual de alteração dos níveis de DA a partir da baseline e posteriormente transformados em z-score para melhor representação dos dados. Os dados são expressos em média \pm SEM. $p > 0.05$.



De maneira especial, podemos observar que apesar da ausência de diferenças estatísticas devido a variabilidade dos dados e pequeno número de animais por grupo, o tratamento com haloperidol demonstrou tendências em apresentar maiores alterações quanto a concentração de DA, sendo esta imediatamente após a mudança de contextos e mais tardia após a manipulação do animal, em relação aos grupos salina e SCH23390, conforme demonstrado na figura 11. Os grupos salina e SCH23390 apresentaram tendências em alterar as concentrações de DA após a troca de contexto tal como após a manipulação que ocorreu após 1 hora no contexto B, entretanto, esta teve uma tendência de ocorrer em uma ordem de magnitude menor da apresentada pelo grupo haloperidol.

Figura 11. O haloperidol apresentou tendências em aumentar as concentrações de DA na presença de variações ambientais e após a manipulação do animal. Os dados foram inicialmente normalizados em percentual de alteração dos níveis de DA a partir da baseline e posteriormente transformados em z-score para melhor representação dos dados. Os dados são expressos em média \pm SEM. $p > 0.05$.

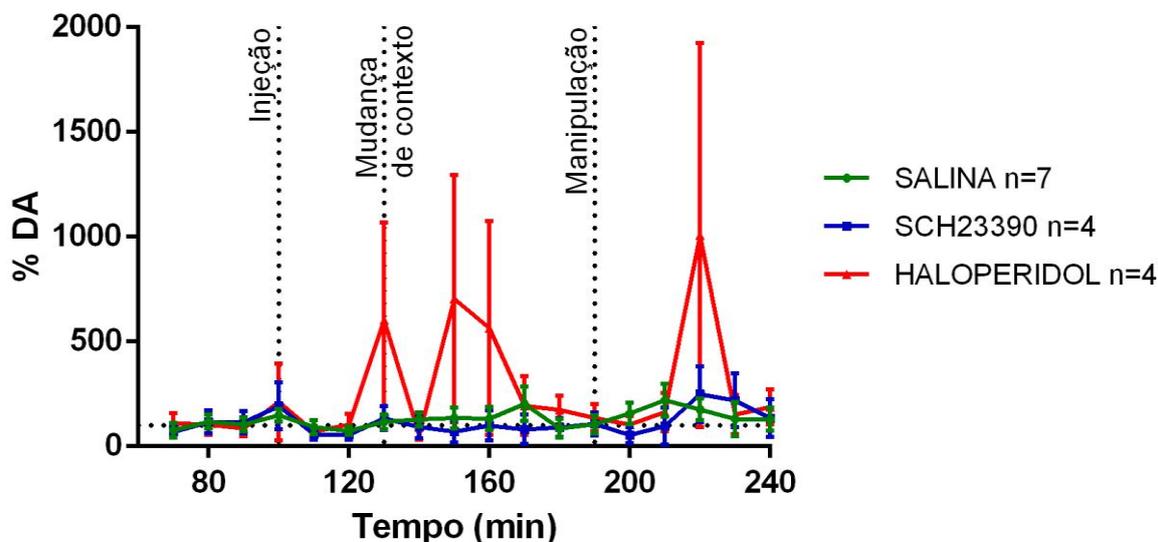
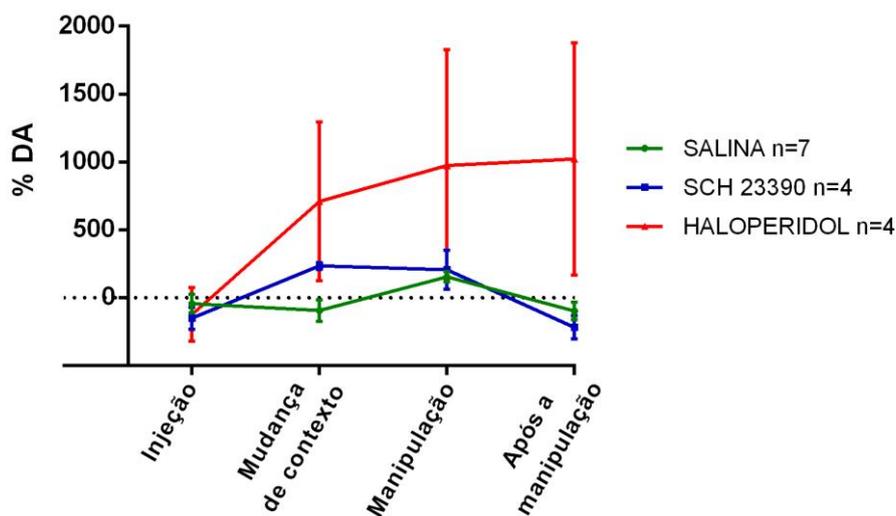


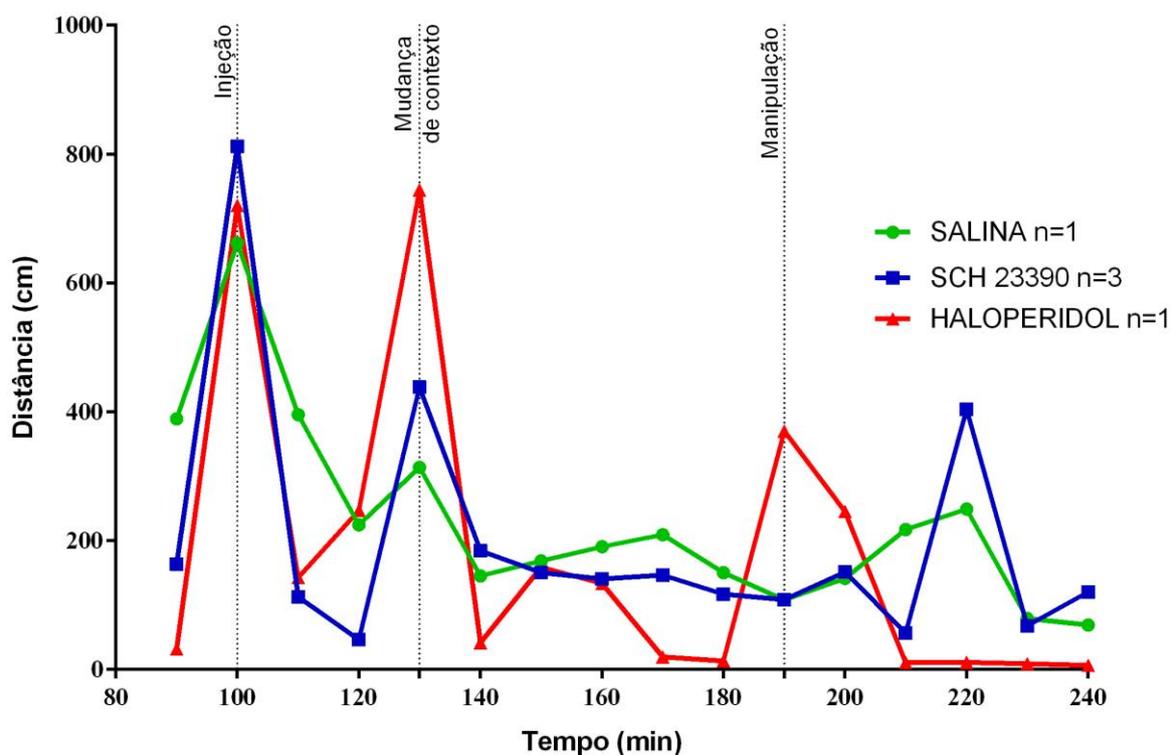
Figura 12. Administração de haloperidol promoveu tendências em aumentar os percentuais de alteração nas concentrações de DA a partir da mudança de contexto, assim como na manipulação animal após o cálculo dos valores de delta. Os dados são expressos em relação os valores de delta. Dados são expressos em média \pm SEM. $p > 0.05$.



As tendências em relação ao aumento nos níveis de DA promovidas pela administração de haloperidol são mais evidentes após a realização do cálculo dos valores de delta (figura 12). Podemos observar que após a administração de haloperidol houve um aumento de 569% em relação a mudança de contexto e 782% em relação ao evento de manipulação do animal e 821% no período subsequente a realização desta manipulação.

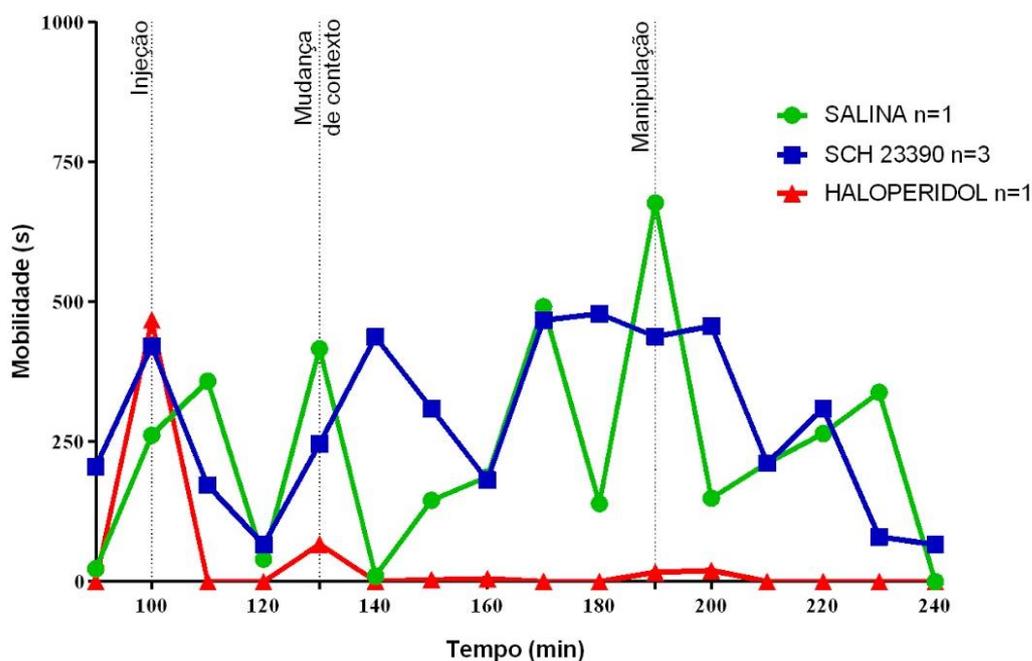
Em relação a atividade locomotora (figura 13), esta foi obtida a partir dos registros de vídeos durante as 4 horas de experimento. Quanto a esta análise, até o presente momento possuímos um número menor de animais cuja atividade fora analisada (solução salina: n=1, SCH23390: n=3 e haloperidol: n=1), fato que nos limita a interpretação dos dados e possíveis correlações desta atividade locomotora com os níveis de DA apresentados na mesma janela temporal. Desta forma, devido a limitação promovida pelo baixo poder amostral podemos apenas descrever brevemente os dados obtidos. Apesar disto, podemos observar de maneira interessante que todos os 3 grupos experimentais apresentaram aumento na distância (em cm) percorrida tanto após o evento de administração (seja ela salina, SCH 23390 ou haloperidol), troca contextual e após a manipulação no contexto B.

Figura 13. Procedimentos de administração de fármacos ou veículo, mudança de contexto e a manipulação do animal causaram aumento de locomoção. Os dados de locomoção são expressos no total de centímetros percorridos em um período de 10 minutos. Os dados são expressos na média \pm SEM.



Outro parâmetro de atividade motora avaliado foi o estado de atividade (figura 14). Neste parâmetro breves movimentos foram considerados com um estado ativo do animal, mesmo que o mesmo não movesse de posição seu eixo central. Podemos observar que aparentemente mesmo possuindo valores de distância percorrida similares aos outros grupos experimentais, o grupo tratado com haloperidol diminuiu o tempo de mobilidade após a administração deste fármaco, o que não se observou nos grupos administrados com solução salina 0,9% ou SCH 23390, que tiveram mobilidade mais acentuada após a mudança de contexto e manipulação.

Figura 14. A mudança de contexto e a manipulação do animal causaram aumento no tempo de mobilidade nos grupos que receberam solução salina e SCH23390, e diminuiu o tempo de mobilidade no grupo administrado com haloperidol. Os dados são expressos na média \pm SEM.



4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Este estudo teve como principal objetivo verificar se alterações ambientais e o procedimento de manipulação do animal promoveria um aumento nos níveis de liberação de DA e se este aumento seria responsável pela promoção de um estado de elevado *arousal*, utilizando desta forma a atividade motora como um indicador dos níveis de *arousal*. Da mesma forma buscamos observar se seria a ativação do receptor D2 o promotor deste estado de elevado *arousal*.

A nossa hipótese que a dopamina estaria modulando este estado de elevada *arousal*, e isto ocorrendo via ativação de receptores D2 baseia-se no trabalho de nossos colaboradores (dados ainda não publicados) onde é demonstrado que durante sessões de condicionamento Pavloviano após a administração de fármacos antagonistas de receptores dopaminérgicos D1 e D2 no decorrer da sessão os animais começam a reduzir a sua resposta condicionada apresentando um comportamento tipo-extinção, isto estando correlacionado com um comportamento de baixa excitação. Entretanto após animais do grupo controle e do grupo que recebeu a administração de um antagonista de receptores dopaminérgicos D1 serem movidos para uma diferente caixa de comportamento ou a ocorrência de um breve período de manipulação estes animais apresentavam novamente elevados níveis de resposta condicionada, isto estando relacionado a um alto nível de *arousal*. Entretanto nos animais onde fora administrado um antagonista de receptores dopaminérgicos D2 (haloperidol) estes animais não apresentam este aumento dos níveis de resposta condicionada. Desta forma levantando-se a hipótese que este estado de *arousal* e consequente aumento dos níveis da resposta condicionada estavam relacionados aos níveis tônicos de DA e a ligação desta aos receptores D2.

Até o presente momento os resultados obtidos sugerem tendências que a liberação tônica de DA após a administração de haloperidol nos eventos de interesse foi elevada em relação aos outros grupos experimentais, e isto era de certa forma esperado pelo fato que receptores do tipo D2 podem ser expressos tanto na região pré ou pós-sináptica, tendo a expressão destes receptores na região pré-sináptica função de inibir a liberação de DA pelo neurônio pré-sináptico (STANDAERT e GALANTER, 2012). Porém, de maneira interessante observamos tendências de uma redução do estado de atividade após o bloqueio dos receptores D2 pelo haloperidol,

apesar do aumento observado nos níveis de DA. Caso este padrão de atividade se mantenha consistente após adicionarmos mais animais aos grupos experimentais poderíamos estar confirmando a nossa hipótese inicial que a DA estaria relacionada aos estados de elevado *arousal* e que este processo estaria sendo modulado por receptores D2.

Alterações no estado de *arousal* podem justificar alguns distúrbios neuropsiquiátricos, onde estados de elevado *arousal* são responsáveis por esquizofrenia e dependência (CARLSSON, 1995) e estados de baixo *arousal* estão associados com depressão e transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (HALLER *et al.*, 2005; MIANO *et al.*, 2006). A DA no NAc está ligada a modulação da atividade locomotora (JONES e MOGENSON, 1980) reforçando assim um possível papel da DA com a modulação do estado de *arousal*.

Devido ao fato que o presente experimento ainda encontra-se em andamento, não possuindo ainda um N experimental completo, faz com que os dados apresentados sejam dispostos na forma de demonstração de algumas tendências existentes até o momento. Esperamos que com o aumento do N experimental e a adição de análises adicionais quanto às alterações nos níveis de DA e também as análises de parâmetros locomotores possam nos proporcionar uma melhor descrição do papel da dopamina tônica em relação a atividade locomotora e um possível papel dos receptores D2 neste processo.

REFERÊNCIAS

- BASi Better Data Driving Better Decision. Disponível em: <<https://www.basinc.com/microdialysis-probes/BR-brain>>. Acesso em: 14 de novembro de 2019.
- BASi Better Data Driving Better Decision. Disponível em: <[basinc.com/microdialysis-cannula/intracerebral-br](https://www.basinc.com/microdialysis-cannula/intracerebral-br)>. Acesso em: 14 de novembro de 2019.
- BJORKLUND, A.; DUNNETT, S.B. Dopamine neuron systems in the brain: an update. **Trends in Neurosciences**, v. 30, n. 5, p.194-202, 2007.
- BONGAERTS, J.; BUNDEL, D.; MANGELINGS, D.; SMOLDERS, I.; HEYDEN, Y. V.; EECKHAUT, A. V. Sensitive targeted methods for brain metabolomic studies in microdialysis samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 161, p. 192-205, 2018.
- CALABRESI, P.; PICCONI, B.; TOZZI, A. *et al.* Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. **Nat Neurosci** v. 17, p.1022 - 1030, 2014.
- CARLSSON, A. Neurocircuitries and neurotransmitter interactions in schizophrenia. *Int Clin Psychopharmacol*, v.10, p. 21 - 28, 1995.
- CARLSSON, K.; PETERSSON, K. M.; LUNDQVIST, D.; KARLSSON, A.; INGVAR, M.; ÖHMAN, A. Fear and the Amygdala: Manipulation of Awareness Generates Differential Cerebral Responses to Phobic and Fear-Relevant (but Nonfeared) Stimuli. **Emotion**, v. 4, p. 340 - 353, 2004.
- CHEFER, V. I.; THOMPSON, A. C.; ZAPATA, A.; SHIPPENBERG, T. S. Overview of brain microdialysis. **Current protocols in neuroscience**, v. 47, p. 7.1.1-7.1.28, 2009.
- COUSINS, D. A.; BUTTS, K. AND YOUNG, A. H. The role of dopamine in bipolar disorder. **Bipolar Disorders**, v. 11, p. 787-806, 2009.
- DA CUNHA, C.; GOMEZ-A, A.; BLAHA, C. D. The role of the basal ganglia in motivated behavior. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 23, n. 5-6, p. 747-767, 2012.
- DEL CAMPO, N.; CHAMBERLAIN, S.R; SAHAKIAN, B.J.; ROBBINS, T. W. The Roles of Dopamine and Noradrenaline in the Pathophysiology and Treatment of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder, **Biological Psychiatry**, v. 69, n. 12, p. 145 - 157, 2011.
- DELONG, M. R.; WICHMANN, T. Circuits and Circuit Disorders of the Basal Ganglia. **Arch Neurol**. v. 64, p. 20 - 24, 2007.
- ESTEVINHO, M. F.; SOARES-FORTUNATO, J.M. Dopamina E Receptores. **Revista Portuguesa de Psicossomática**, v. 5, n. 1, p. 21 - 31, 2003.

FRISINA, P. G.; HAROUTUNIAN, V.; LIBOW, L. S. The neuropathological basis for depression in Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders*, v. 15, p. 144–148, 2009.

GADDUM, J. Push-pull cannulae. *J Physiol*. 155: p. 1-2, 1961.

GARRIS, P. A.; REBEC, G. V. Modeling fast dopamine neurotransmission in the nucleus accumbens during behavior. *Behavioural Brain Research*, v. 137, n. 1-2, p. 47-63, 2002.

GIACINO, J.T.; FINS, J.J.; LAUREYS, S.; SCHIFF, N.D. Disorders of consciousness after acquired brain injury: the state of the science. *Nature Rev. Neurol.*, V. 10, p. 99 - 114, 2014.

Gomez-A, A.; Fiorenza, A. M.; Boschen, S. L. ; Sugi, A. H.; Beckman, D.; Ferreira, S.T.; Lee, K.; Blaha, C.D.; Da Cunha, C. Diazepam Inhibits Electrically Evoked and Tonic Dopamine Release in the Nucleus Accumbens and Reverses the Effect of Amphetamine. *ACS Chem. Neurosci.* v. 8, n. 2, p. 300 - 309, 2017.

GRACE, A. A. The tonic/phasic model of dopamine system regulation and its implications for understanding alcohol and psychostimulant craving. *Addiction*, v. 95, p. 119-128, 2000.

HALLER, J.; TOTH, M.; HALASZ, J. The activation of raphe serotonergic neurons in normal and hypoarousal-driven aggression: A double labeling study in rats. *Behav Brain Res*, v.161, p. 88 - 94, 2005.

IKEMOTO, S.; QIN, M.; LIU, Z. H. The functional divide for primary reinforcement of D-amphetamine lies between the medial and lateral ventral striatum: is the division of the accumbens core, shell, and olfactory tubercle valid?. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 25, n. 20, p. 5061 - 5065, 2005.

Ikemoto, S. Dopamine reward circuitry: Two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens–olfactory tubercle complex, *Brain Research Reviews*, v. 56, n. 1, p. 27-78, 2007.

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

JONES, D. R.; MOUSSAUD, S.; McLean, P. Targeting heat shock proteins to modulate α -synuclein toxicity. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, v. 7, n. 1, p. 33-51, 2014.

JUSTICE, J. B. Jr Quantitative microdialysis of neurotransmitters. *J.Neurosci. Methods*, v. 48, n. 3, p. 263-276, 1993.

KELLY, P. H.; SEVIOUR, P. W.; IVERSEN, S. D. Amphetamine and apomorphine responses in the rat following 6-OHDA lesions of the nucleus accumbens septi and corpus striatum. **Brain Research**, v. 94, n. 3, p. 507-522, 1975.

LAUREYS, S.; SCHIFF, N.D. Coma and consciousness: paradigms (re)framed by neuroimaging. **Neuroimage**, V. 61, p. 478 - 491, 2012.

MIANO, S.; DONFRANCESCO, R.; BRUNI, O.; FERRI, R.; GALIFFA, S.; PAGANI, J.

NREM Sleep Instability is Reduced in Children With Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. **Sleep**. v. 29, n. 6, p. 797 - 803, 2006.

MISSALE, C.; NASH, S. R.; ROBINSON, S. W.; MOHAMED, J.; CARON, M. G. Dopamine Receptors: From Structure to Function. **Physiological Reviews**, v. 78, n. 1, p. 189-225, 1998.

MOGENSON, G. J.; JONES, D. L.; YIM, C. Y. From motivation to action: Functional interface between the limbic system and the motor system. **Progress in Neurobiology**, v. 14, n. 2–3, p. 69-97, 1980.

MOITA, L. A.; PACHECO, G.; SILVA, V. N.; COSTA, D. S.; SOUZA, F. M.; MENDES, M.G.; FERREIRA, A. M. C.; NOGUEIRA, K. M.; BASTOS, V.H.; VENTURA, C. A. Cromatografia líquida de alta eficiência e suas aplicações nos estudos relacionados a neurociências. **Revista Brasileira de Biodiversidade e Biotecnologia**, Teresina, 2015.

MYERS, R. **Methods for perfusing different brain structures**. In: MYERS R, editor. *Methods in Psychobiology*. v. 2. Academic Press; London: p.169-211, 1972.

MOGHADDAM, B.; ROTH, R. H.; BUNNEY, B. S. Characterization of dopamine release in the rat medial prefrontal cortex as assessed by in vivo microdialysis: comparison to the striatum. **Neuroscience**; v. 36, n. 3, p. 669-676, 1990.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. New York: Academic Press; 2007.

PFAFF, D.W. *Brain Arousal and Information Theory: Neural and Genetic Mechanisms*. Harvard University Press, Cambridge Mass, 2006.

RESSLER, K.J.; MAYBERG, H.S. Targeting abnormal neural circuits in mood and anxiety disorders: from the laboratory to the clinic. **Nat. Neurosci.**, v. 10, p. 1116 - 1124, 2007.

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

ROBINSON, D. L.; WIGHTMAN, R. M. Rapid Dopamine Release in Freely Moving European Journal of Neuroscience Rats. In: MICHAEL, A.C.; BORLAND, L.M., editors. **Electrochemical Methods for Neuroscience**. Capítulo 2, 2007.

SIEGEL, G.; ALBERS, R. W. **Basic Neurochemistry**. London, 2006.

STANDAERT, D.G.; GALANTER, J.M. Farmacologia da Neurotransmissão Dopaminérgica. In: Golan DE, Tashjian AH, Armstrong EJ, Armstrong AW. Princípios da Farmacologia. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.166-185, 2012.

TRITSCH, N.X.; SABATINI, B.L. Dopaminergic Modulation of Synaptic Transmission in Cortex and Striatum, **Neuron**, v. 76, n.1, p. 33 - 50, 2012.

UNGERSTEDT, U.; PYCOCK, C. Functional correlates of dopamine neurotransmission. **Bull Schweiz Akad Med Wiss**, v. 30, n. 1-13, p. 44-55, 1974.

UNGERSTEDT, U.; HERRERA-MARCHINTZ, M.; JUNGNELIUS, U.; STAHL, L.; TOSSMAN, U.; ZETTERSTROM, T. Dopamine synaptic mechanisms reflected in studies combining behavioral recordings and brain dialysis. In: Kotisaka M, editor. **Advances in Dopamine Research**, p.219-231, 1982.

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.

WATSON, C. J.; VENTON, B. J.; KENNEDY, R. T. In Vivo Measurements of Neurotransmitters by Microdialysis Sampling. **Analytical Chemistry**, v. 78, p.1391-1399, 2006.

WESTERINK, B. H. C.; JUSTICE, J. B. Jr. Microdialysis compared with other in vivo release models. In: ROBINSON, T.E; JUSTICE, JR. J. B, editores. **Microdialysis in the neurosciences** Nova York: Elsevier Science Publishers; p. 23-43, 1991.