

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM
NEUROCIÊNCIAS**

José Cláudio Rodrigues da Silva

**CARACTERIZAÇÃO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA DOS
NEURÔNIOS DOPAMINÉRGICOS DOS GRUPOS A8, A9 E A10 DE
CAMUNDONGOS EM UM MODELO TRANSGÊNICO DE
PARKINSON USANDO O *CLARITY*.**

Belo Horizonte

2015

José Cláudio Rodrigues da Silva

**CARACTERIZAÇÃO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA DOS
NEURÔNIOS DOPAMINÉRGICOS DOS GRUPOS A8, A9 E A10 DE
CAMUNDONGOS EM UM MODELO TRANSGÊNICO DE
PARKINSON USANDO O *CLARITY*.**

Projeto de Mestrado apresentado ao

Programa de Pós Graduação em Neurociências da

Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de

Especialista em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Rezende de Souza

Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Ribeiro Resende

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2015

043

Silva, José Cláudio Rodrigues da.

Caracterização por imunofluorescência dos neurônios dopaminérgicos dos grupos A8, A9 e A10 de camundongos em um modelo transgênico de Parkinson usando o Clarity [manuscrito] / José Cláudio Rodrigues da Silva. – 2016.
16 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Bruno Rezende de Souza. Co-orientador: Rodrigo Ribeiro Resende.
Projeto de mestrado – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Mapeamento cerebral - Teses. 2. Parkinson – Teses. 3. Clarity, Técnica de – Teses. 4. Neurociências - Teses. I. Souza, Bruno Rezende de. II. Resende, Rodrigo Ribeiro. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612

Sumário

Introdução	04
Relevância e Justificativa	10
Objetivos	12
Metodologia	12
Análise da viabilidade ética e técnica	13
Cronograma	14
Referências Bibliográficas	15

Introdução

Mapeamento tecidual

O entendimento das relações estrutura-função em escalas celular, de circuitos e sistêmica requerem mapas anatômicos e mapeamento de neurotransmissores em 3D, atualmente não disponíveis para uma variedade de órgãos entre as diferentes espécies. Na raiz desta deficiência de conhecimento está a inexistência de um método que permita o imageamento de órgãos *in totum*. Um dos objetivos da neurociência moderna é mapear a arquitetura de circuitos neurais com alta resolução (nível de circuitos) e amplitude (ao longo do cérebro). Este desafio tem chamado a atenção de gerações de cientistas, começando no século XIX com Ramón y Cajal, que estudou detalhadamente neurônios visualizados com razoável resolução pela coloração de Golgi enquanto ainda embebidos em tecido cerebral semi-intacto. Princípios fundamentais para o entendimento de sistemas neurais podem resultar de tal abordagem integrativa, mas embora progressos tenham sido atingidos, muitos desafios e oportunidades permaneceram.

Nas últimas décadas, a microscopia eletrônica emergiu como modelo fundamental na descrição de detalhes da estrutura dos circuitos neurais (BOCK, 2011; BRIGGMAN et al., 2011). O avanço chave da microscopia eletrônica neste assunto foi a identificação de zonas pre-sinápticas ativas contendo vesículas de neurotransmissores opostas a estruturas pós-sinápticas. Além disso, a microscopia eletrônica facilitou a visualização de detalhes dos axônios, contudo, o mapeamento de tecidos por microscopia eletrônica requer passos relativamente lentos envolvendo secções ultrafinas e ou ablação e reconstrução; ainda mais importante, a preparação da amostra para contraste é em grande escala incompatível com um fenótipo molecular rico que poderia oferecer informações críticas sobre o tipo de célula e de sinapse. No plano ideal, os dados resultantes do mapeamento de cérebros intactos deveriam ser associados a informação molecular sobre o tipo de células e sinapses que são visualizadas estruturalmente, e até mesmo informações dinâmicas sobre histórico de padrões de atividade natural (no caso do mesmo circuito) sabidas como causalmente relevantes ao comportamento animal. Métodos adequados de abordagem de imagem por luz, combinados com marcação molecular genética ou histoquímica, têm surgido como ferramentas importantes para a visualização da arquitetura estrutural, molecular e funcional de tecidos biológicos, com uma importância particular no estudo da neuroanatomia.

Métodos confocais revolucionaram a microscopia óptica permitindo a secção óptica espessa (dezenas de micrômetros) de amostras marcadas por fluorescência, permitindo assim a reconstrução tridimensional sem a necessidade de secções ultrafinas (CONCHELLO; LICHTMAN, 2006). A microscopia bifotônica aumentou a profundidade de acesso da imagem (para centenas de micrômetros) mesmo em amostras de tecidos vivos (HELMCHEN; DENK, 2005), e abordagens ópticas adaptadas aumentaram a profundidade de imagem ainda mais (TANG et al., 2012). Contudo, a microscopia óptica tem limitações ao imageamento através do sistema nervoso vertebrado intacto (por exemplo, o cérebro de camundongos se estende por muitos milímetros na menor dimensão espacial, e são opacos nesta escala para a microscopia óptica típica). Uma manobra típica para contornar tais limitações tem sido fatiar o cérebro em finas secções, de maneira manual, seguidos por microscopia confocal ou imageamento bifotônico (MICHEVA et al., 2010; RAGAN et al., 2012); entretanto, a marcação e reconstrução detalhada destas secções finas tem sido (até agora) limitada a pequenos volumes de tecido. Uma abordagem ideal e integrativa seria marcar e imagear cérebros vertebrados intactos em alta resolução.

Como passo nessa direção, novos métodos foram aparecendo para aumentar a transparência (DODT, 2007; HAMA, 2011; KE et al., 2013) através da redução da difração da luz que atravessa a amostra de tecido. Tais métodos incluem RIMS (*refractive index matching solution*) e PARS (*perfusion-assisted agent release in situ*), como métodos de perfusão e clareamento de tecidos. Embora intrigantes e efetivas estas abordagens geralmente não são adequadas para o detalhamento fenotípico molecular, já que a maioria dos tecidos (tal como cérebros intactos adultos) permanecem largamente impenetráveis a anticorpos macromoleculares ou marcadores oligonucleotídicos (KIM et al., 2013). Quando pedaços de tecidos moles, tais como glândulas mamárias, são corados usando-se soluções clareadoras hidrofóbicas que reduzem as barreiras lipídicas à marcação por anticorpos, os fluoróforos tornam-se altamente instáveis ou extintos no processo de clareamento, no entanto esta etapa tem que seguir à fase de marcação por anticorpos, ou a transparência é perdida (ERTUK, 2012). Estas limitações motivaram o recente desenvolvimento do *CLARITY* (Clear, Lipid-exchanged, Acrylamide-hybridized Rigid, Imaging/immunostaining compatible, Tissue hYdrogel) (KIM et al., 2013; CHUNG; DEISSEROTH, 2013), que envolve a remoção de lípidos num ambiente hidrofílico quimicamente estável para atingir a transparência em tecidos intactos,

garantindo o acesso de marcadores por anticorpos e de ácidos nucleicos ao conteúdo biomolecular nativo, preservando a ultraestrutura e a fluorescência.

A plataforma técnica do CLARITY permite múltiplas rodadas de interrogação molecular, estrutural e de atividade através de cérebros mamíferos *in totum*; isto tem relevância não apenas para as neurociências, mas também para a pesquisa em qualquer sistema biológico intacto. Até o momento o CLARITY tem sido usado para o estudo de cérebros de camundongo e zebrafish além de cérebros humanos *post mortem* (CHUNG, 2013), mas o protocolo pode ser adaptado a diversos outros tecidos de acordo com o objetivo do pesquisador.

O clareamento de tecidos pelo método CLARITY

A técnica do CLARITY se funda em princípios químicos para construir polímeros de hidrogel de dentro para fora do tecido a fim de oferecer um suporte para o conteúdo biomolecular protéico.

Uma característica adicional do híbrido tecido-hidrogel é que ele pode ser submetido a múltiplas rodadas de interrogação molecular. Tipicamente os métodos de imunohistoquímica apenas permitem a investigação de dois ou três biomarcadores por vez em uma amostra de tecido, mas um número maior de marcadores simultâneos é necessário para definir as células em termos de uma identidade genética e molecular precisa, sua circuitaria e histórico de atividades. Esta limitação é tradicionalmente contornada pela combinação de múltiplas amostras em um atlas padrão de referência, todavia, essa estratégia falha em caracterizar fenotipicamente e em profundidade células individuais, não podendo capturar a estatística conjunta entre os diferentes tipos de marcadores dentro de uma única preparação e sofre de alinhamento de artefatos 3D e variabilidade entre diferentes amostras de tecido individual. Ao permitir múltiplas rodadas de marcação histoquímica e eluição no mesmo tecido, o CLARITY proporciona acesso pouco usual a informações moleculares e estruturais.

Dopamina: histórico

A Dopamina como neurotransmissor independente no sistema nervoso central foi descoberta na Suécia, pelo farmacologista Arvid Carlsson em 1957, quando trabalhava no Departamento de Farmacologia da Universidade de Lund. Esta descoberta teve tremendo impacto na neurociência moderna e – em combinação com seus trabalhos posteriores na Universidade de Goteborg – renderam ao Prof. Carlsson o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 2000.

A amina 3,4-dihidroxifeniletanamina (IUPAC) (Dopamina) foi inicialmente identificada como um intermediário na síntese da noradrenalina e adrenalina a partir da tirosina. Em 1957, Arvid Carlsson, Margit Lindqvist, Tor Magnusson e Bertil Waldeck, fizeram as observações seminais que, nos anos subsequentes, levariam à revelação da dopamina como um transmissor no sistema nervoso central, independentemente de seu papel como precursor na síntese da adrenalina e noradrenalina.

Em seus artigos de 1957 e 1958 (CARLSSON et al., 1957; CARLSSON et al., 1958) Carlsson e seus colaboradores fizeram a intrigante observação de que os efeitos acinéticos da reserpina poderiam ser revertidos por uma injeção intravenosa do precursor da dopamina (e noradrenalina), a 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA). O efeito funcional estava correlacionado a uma recuperação do conteúdo de dopamina, mas não de noradrenalina, no cérebro, sugerindo que a depleção de dopamina, ao invés da de noradrenalina ou serotonina, era a causa do estado acinético em animais tratados com reserpina. No ano que se seguiu, Carlsson, Bertler e Rosengren (BERTLER; ROSENGREN, 1959) e Sano e seus colaboradores no Japão (SANO et al., 1959), relataram que a massa de dopamina cerebral estava localizada no *striatum* (uma estrutura contendo pouca noradrenalina), assim dando suporte à ideia de que este novo e suposto transmissor poderia ter papel no controle da função motora (CARLSSON, 1959).

Na primeira década após sua descoberta a dopamina atraiu pouca atenção. Uma pesquisa na PubMed mostra que durante a década de 60 a pesquisa sobre este novo neurotransmissor ficou para trás de outros neurotransmissores clássicos como noradrenalina, serotonina e acetilcolina. O ponto de inflexão foi por volta de 1967, ano em que Cotzias iniciou a terapia com L-DOPA. O número de artigos publicados naquele ano, como listado no PubMed, foi de 234. Dez anos depois a taxa de publicação tinha aumentado em dez vezes, quase alcançando a da noradrenalina.

O aumento dramático coincidiu com a introdução de uma série de novas ferramentas farmacológicas e neuroquímicas para o estudo de neurônios dopaminérgicos e suas funções no cérebro, bem como a identificação dos receptores de dopamina, sua farmacologia, e seu papel na mediação da ação antipsicótica dos neurolépticos (KEBABIAN et al., 1972; SEEMAN et al., 1976).

A descoberta da dopamina como um neurotransmissor no cérebro foi um dos eventos seminais no desenvolvimento da neurociência moderna. A pesquisa sobre a neurotransmissão dopaminérgica permaneceu altamente dinâmica através dos anos sendo extremamente importante para moldar nosso entendimento de como o cérebro funciona no normal e no patológico. A dopamina revelou-se com papel fundamental em quase todos os aspectos do comportamento: do controle motor à regulação do humor, cognição, adição, e recompensa. Na adição, a dopamina tem sido única dentro da neurociência ao fazer a ponte entre a ciência básica e a prática clínica.

A demonstração do envolvimento da dopamina não apenas nas desordens do movimento como o Parkinson, e os efeitos colaterais parkinsonianos das drogas anti- esquizofrênicas, mas também como componente central em desordens cognitivas e motivacionais, incluindo os sintomas positivos da esquizofrenia, drogadição, e desordem hiperativa do déficit de atenção (TDHA), levou os estudos sobre a dopamina a permanecerem na linha de frente da pesquisa em psicofarmacologia desde a década de 70 (IVERSEN, 2007).

Dopamina e neurônios dopaminérgicos

A Dopamina (DA), assim como todas as aminas biogênicas são sintetizadas a partir do aminoácido Tirosina que é primeiro convertido em L-dihidroxi-fenilalanina (L-DOPA) pela enzima tirosina hidroxilase (Th). A L-DOPA é então transformada em DA pela ação da L-aromático-aminoácido-descarboxilase. Os neurônios que sintetizam e liberam dopamina como neurotransmissor são por definição **dopaminérgicos** (SLAMES; HOBERT, 2011) embora, estudos recentes têm sugerido que alguns desses neurônios são capazes de co-liberar outros neurotransmissores tais como Glutamato (HNASKO et al., 2010, STUBER et. al., 2010) ou GABA (TRITSCH, 2012).

Nas células receptoras, o efeito da DA é mediado pelos receptores acoplados da proteína G que são divididos em dois grandes grupos baseado em suas afinidades de ligação e

especificidades: tipo D1: subtipos D1 e D5; tipo D2: subtipos D2, D3 e D4. Seis anos após sua descoberta por Carlsson e colaboradores, Dahlstrom e Fuxe em 1964 dividiram os neurônios dopaminérgicos baseados em suas localizações estereotáxicas. Depois da introdução da imunohistoquímica, o sistema dopaminérgico pôde ser investigado em maior detalhe, embora a nomenclatura original tenha permanecido (BJORKLUND; DUNNETT, 2007). Hoje, 10 grandes núcleos dopaminérgicos podem ser identificados em mamíferos. Populações mais rostrais são encontradas no telencéfalo, compondo o grupo A16 de neurônios do bulbo olfatório, interneurônios periglomerulares e o grupo A17 de interneurônios amácrinos na retina, nenhum deles possuindo dendritos (PRAKASH, 2006; WURST, 2006; TURIAULT, 2007).

Outro grupo de neurônios dopaminérgicos compondo os núcleos A15-A11 ocupam várias partes do diencefalo. A localização do grupo A15 é controversa dentro da literatura já que é identificado tanto no núcleo preóptico (MOLNAR, 1994), quanto no núcleo supraóptico (PRAKASH; WURST, 2006); de acordo com o autor ou o núcleo é excluído ou está ausente (ALBANESE, 1986, OU et al., 2006). O núcleo adjacente A14 está localizado no hipotálamo paraventricular e os maiores núcleos A13 e A11, estão localizados no hipotálamo posterior e na zona incerta (ZI) no tálamo ventral, respectivamente (PRAKASH, 2006; WURST, 2006). O núcleo restante A12 inclui os neurônios DA do hipotálamo tuberoinfundibular (TIDA) que se originam no núcleo arqueado (ARC) (BENSKEY et al., 2012; PHELPS, 2004). Populações neuronais constituindo a origem do sistema DA mesencefálico estão predominantemente localizados na região ventral do cérebro médio: o núcleo A9 está localizado na *substantia nigra* (SN) e o núcleo A10, está localizado na área tegmental ventral. O núcleo mais caudal A8 compreende os neurônios dopaminérgicos do núcleo retrorubro (BJORKLUND; DUNNETT, 2007; PRAKASH; WURST, 2006). Além dos núcleos A16-A8, subpopulações de aproximadamente 1000 neurônios dopaminérgicos (em ratos) têm sido identificadas no núcleo dorsal da rafe (DRN) e regiões ventrolateral e periaquedutal cinzentas (vlPAG). Estes núcleos são geralmente referenciados como a extensão rostral-caudal do grupo A10 (DOUGALIS et al., 2012). Todos os neurônios dopaminérgicos listados acima recebem entradas de, e projetam para outras partes do cérebro, modulando assim diferentes aspectos do comportamento.

Doença de Parkinson

A Doença ou Mal de Parkinson (DP) é uma desordem neurológica degenerativa progressiva do sistema nervoso central que acomete, principalmente o sistema motor. Atinge cerca de 1% da população mundial acima de 60 anos de idade (MUNCHAU; BHATIA, 2000).

A principal característica observada em pacientes é a intensa perda de neurônios dopaminérgicos predominantemente na *substantia nigra*, componente do sistema motor extrapiramidal relacionada diretamente com a coordenação dos movimentos. Sua origem neuroquímica foi descoberta nos anos 60 por Hornykiewicz (1962), que mostrou que o conteúdo de dopamina da *substantia nigra* e do corpo estriado (via nigroestriatal, responsável por cerca de 75% da dopamina cerebral), em cérebros *post mortem* de pacientes com DP, era extremamente baixo (menos de 10% do normal) (RANG et al., 2004). Infelizmente, os sintomas da DP aparecem somente quando o conteúdo de dopamina do corpo estriado diminuiu para cerca de 80% do normal.

Os neurônios colinérgicos intrínsecos da via nigroestriatal também estão envolvidos na DP. A dopamina atua primariamente como neurotransmissor inibidor da via, e a acetilcolina, como estimulador. Com a perda de neurônios dopaminérgicos, o equilíbrio existente entre ambos os neurotransmissores se perde, havendo uma excessiva atividade dos neurônios colinérgicos. Supõe-se que a hiperatividade desses neurônios, associada com a falta de dopamina, leve aos sintomas do parkinsonismo (RANG et al., 2004).

Relevância e justificativa

As doenças neurodegenerativas representam um dos grandes desafios da neurociência atual. A Doença de Parkinson acomete cerca de 6,5 milhões de pessoas no mundo todo; 1,2 milhões só na Europa a um custo anual de cerca de 13,9 bilhões de Euros/ano. Estima-se que o número de pacientes deva triplicar nos próximos 20 anos, especialmente nos países centrais com o envelhecimento populacional. A dopamina (DA) é um neurotransmissor crucial para muitos processos biológicos relevantes na saúde e na doença e sua circuitaria fina ainda é pouco compreendida.

Nas últimas três décadas numerosos estudos de neuroimagem revelaram anormalidades estruturais e funcionais no cérebro de pacientes portadores de doenças

neurodegenerativas e neuropsiquiátricas. Aumento e decréscimo no volume cerebral assim como mudanças na atividade e no repouso têm sido descritas em pacientes com esquizofrenia, desordem bipolar, depressão, TDAH, autismo, Alzheimer e Parkinson. As mudanças estruturais e funcionais são frequentemente encontradas em múltiplas e discretas áreas do cérebro que incluem os córtices frontal, parietal, lateral, occipital, assim como áreas intra e subcorticais do cérebro. O diagnóstico clínico mostra mudanças cerebrais tanto sobrepostas quanto segregadas, como por exemplo, entre a esquizofrenia e a desordem bipolar e entre a depressão unipolar e bipolar. Entretanto, enquanto as mudanças estruturais e funcionais cerebrais em pacientes são encontradas em áreas anatómicas separadas, estas são conectadas por fibras de longa distância que, conjuntamente formam redes neurais complexas. Assim, ao invés de representar entidades (pato) fisiológicas separadas, essas mudanças cerebrais locais no cérebro de pacientes com doenças psiquiátricas e neurodegenerativas podem de fato representar diferentes partes do mesmo sistema, i.e., uma rede cerebral alterada. De maneira similar, as mudanças locais no cérebro desses pacientes, embora possam parecer locais, podem em conjunto ser algo mais, e de fato representar todo um grande circuito(s) neural(ais) alterado(s).

A caracterização bioquímica, morfológica e funcional da circuitaria cerebral e de seus subcircuitos é pivotal para o entendimento da fisiologia cerebral e também da fisiopatologia das diversas doenças psiquiátricas e neurodegenerativas.

O método CLARITY por suas características intrínsecas oferece uma enorme gama de possibilidades interrogatórias no estudo da estrutura fina do cérebro (anatômica e bioquímica) e de sua organização morfofuncional tanto no normal quanto no patológico. Assim, este projeto justifica o uso de verba pública de pesquisa pelas possibilidades que seus resultados podem oferecer ao estudo das doenças psiquiátricas e neurodegenerativas, em especial para a doença de Parkinson.

Objetivo(s)

Objetivo geral

Caracterizar a distribuição dos neurônios dopaminérgicos dos Grupos A8, A9 e A10 no cérebro de camundongos adultos *wild* e em modelo knock-out de Parkinson **Lrrk2** usando a técnica do *CLARITY*.

Objetivo(s) específico(s)

- 1) Padronizar a técnica do *CLARITY* para uso em imunohistoquímica de tecidos cerebrais;
- 2) Identificar as vias neurotransmissoras de dopamina, e sua distribuição, nos grupos A8, A9 e A10;
- 3) Avaliar e comparar a distribuição das vias neurotransmissoras no cérebro de camundongos controle e no modelo transgênico adotado.

Metodologia

Animais

Camundongos adultos (2 meses) *wild* e knock-out **Lrrk2** (Jackson Laboratory, USA). Os animais serão agrupados e alojados segundo Santiago, 2010.

Desenho experimental

Os camundongos serão distribuídos em 02 grupos: controle e **Lrrk2**. Depois de anestesiados e perfundidos os animais serão sacrificados e o tecido cerebral preparado para a visualização pelo método *CLARITY*.

Método *CLARITY*

Primeiramente o tecido é perfundido com um coquetel frio (4° C) de monômeros de hidrogel (acrilamida ou bisacrilamida), formaldeído e iniciadores termicamente ativáveis como gatilhos, seguido por uma polimerização do hidrogel a 37° C. O formaldeído serve ao duplo propósito de ligar entre si os tecidos contendo aminas e covalentemente ligar os monômeros de hidrogel a estas moléculas nativas, que incluem proteínas, ácidos nucleicos e outras moléculas pequenas, sem incluir a grande maioria dos fosfolípidos

celulares de membranas. Após o início da polimerização do hidrogel, os lípides (responsáveis por impedir o acesso tanto de fótons como de marcadores moleculares às estruturas profundas) podem ser facilmente removidos sem destruição ou perda dos componentes teciduais nativos usando-se uma solução de detergente iônico forte (borato tamponado 4% (mg/vol) a 37° C. O híbrido tecido-hidrogel, sem lípides e estruturalmente estável obtido é então imerso em uma solução de homogeneização refrativa (glicerol) para obtenção do cérebro intacto e transparente à luz.

Coloração Nissl e quantificação neuronal

Depois de extraído para caracterização neuroquímica, o tecido cerebral (cérebro médio) será congelado em gelo seco; as secções (12 fatias por animal) serão feitas no criostato e coradas pelo método de Nissl. Um software (Image Pro) será usado para criar uma área digital que delimitará a SNpc. O número médio de neurônios será obtido para cada grupo por contagem manual. Coloração e contagem seguirão de acordo com Santiago, 2010.

Análise estatística

As análises estatísticas serão conduzidas usando-se os testes ANOVA e Newman-Keuls. O coeficiente de Pearson será usado para estabelecer as relações entre a concentração de neurotransmissores e os comportamentos correspondentes obtidos no teste de natação forçada. O valor estabelecido de **p** será $\leq 0,05$.

Análise da viabilidade ética e técnica

O Laboratório Sinalização Celular e Nanobiotecnologia (LSCN), sob coordenação do Prof. Rodrigo Ribeiro Resende, possui toda a instrumentação analítica e instrumental para visualização da padronização técnica do *CLARITY* e estudo das vias dopaminérgicas. Entre os equipamentos incluem-se microscopia de fluorescência, espectrofotômetro, para as técnicas de histoquímica (Fluoro-Jade, TUNEL, dihidroetidina) e imuno-fluorescência/immunoblotting. O projeto terá a colaboração do Dr. Mauro Cunha Xavier Pinto (que realiza seu pós-doutorado no LSCN) na realização da preparação e confirmação do método *CLARITY*. O protocolo do pedido de trabalho com os animais será solicitado ao COEPE-UFMG.

CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO

Etapa	Ano 2016		Ano 2017	
	1º Sem.	2º Sem.	1º Sem.	2º Sem.
Cumprimento dos créditos do programa				
Aprofundamento do referencial teórico				
Análise, revisão do material bibliográfico e fichamentos				
Padronização das técnicas laboratoriais				
Experimentação				
Imunofluorescência				
Análise estatística				
Redação inicial				
Qualificação				
Redação final e defesa pública da dissertação				

Referências Bibliográficas

- BERTLER, A.; ROSENGREN, E. Occurrence and distribution of dopamine in brain and other tissues. *Experientia* 15, 10-11, 1959.
- BOCK, D.D. et al. Network anatomy and in vivo physiology of visual cortical neurons. *Nature* 471, 177-182, 2011.
- BRIGGMAN, K.L.; HELMSTAEDTER, M; DENK, W. Wiring specificity in the direction-selectivity circuit of the retina. *Nature* 471, 183-188, 2011.
- CARLSSON, A. et al. 3,4-dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature* 180, 1200, 1957.
- CARLSSON, A. et al. On the presence of 3-hydroxytyramine in brain. *Science* 127, 471, 1958.
- CARLSSON, A. The occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system. *Pharmacol. Rev.* 11, 490-493, 1959.
- CHUNG, K. et al. Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature* 497, 332-337, 2013.
- CONCHELLO, J.A; LICHTMAN, J.W. Optical sectioning microscopy. *Nat. Methods* 2, 920-931, 2005.
- DODT, H. U. et al. Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain. *Nat. Methods* 4, 331-336, 2007.
- ERTUK, A. et al. Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. *Nat. Protocols* 7, 1983-1995, 2012.
- HAMA, H. et al. Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nat. Neuroscience* 14, 1481-1488, 2011.
- HELMCHEN, F.; DENK, W. Deep tissue two-photon microscopy. *Nat. Methods* 2, 932-940, 2005.
- IVERSEN, L.L.; IVERSEN, S.D. Dopamine: 50 years in perspective. *Trends Neurosci.* 30, 188-193, 2007.
- KE, M. T.; FUJIMOTO, S.; IMAI, T. SeeDB: a single and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. *Nat. Neuroscience* 16, 1154-1161, 2013.

KEBABIAN, J.W. et al. Dopamine-sensitive adenylate cyclase in caudate nucleus of rat brain, and its similarity to the “dopamine receptor”. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69, 2145-2149, 1972.

KIM, S. Y.; CHUNG, K.; DEISSEROTH, K. Light microscopy mapping of connections in the intact brain. *Trends Cognit. Sci.* 17, 596-599, 2013.

MICHEVA, K. D.; BUSSE, B.; WEILER, N. C.; O’ROURKE, N.; SMITH, S. J. Single-synapse analysis of a diverse synapse population: proteomic imaging methods and markers. *Neuron* 68, 639-653, 2010.

MÜNCHAU, A.; BHATIA, K.P. Pharmacological treatment of Parkinson’s disease. *Postgrad Med J.* v.76, p. 602-610, 2000.

RAGAN, T. et al. Serial two-photon tomography for automated ex vivo mouse brains imaging. *Nat Methods* 9, 255-258, 2012.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE P.K. Distúrbios neurodegenerativos. In: *Farmacologia*. 5.Ed., Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, p.567-571, 2004.

SANO, I et al. Distribution of catechol compounds in human brain. *Biochim. Biophys. Acta* 32, 586-587, 1959.

SANTIAGO, Ronise Martins. 2010. *Estudo da depressão associada a modelos animais da doença de Parkinson*. 2010. 63 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

SEEMAN, P. et al. Antipsychotic drug doses and neuroleptic/dopamine receptors. *Nature* 261, 717-719, 1976.

TANG, J.; GERMAIN, R. N.; CUI, M. Superpenetration optical microscopy by iterative multiphotons adaptative compensation technique. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 8434-8439, 2012.