

Universidade de São Paulo  
Instituto de Física

Eletrocomunicação em peixes elétricos de  
campo fraco da espécie *Gymnotus carapo* –  
uma aplicação da Teoria da Informação

Caroline Garcia Forlim

Orientador: Prof. Dr. Reynaldo Daniel Pinto

Projeto de Doutorado  
apresentado à FAPESP

São Paulo  
2008

## Resumo

O objetivo deste projeto de doutoramento é o estudo experimental dos padrões de disparo do órgão elétrico de peixes elétricos de campo fraco da espécie *Gymnotus carapo*. Estes peixes produzem tais pulsos para localizar objetos dentro da água e para se comunicar socialmente.

Durante a execução de um projeto de mestrado, desenvolvemos um aparato para obter as medidas destes padrões com o animal isolado de perturbações externas como vibrações mecânicas, sons, campos elétricos e variações de luminosidade do ambiente. A principal característica de nosso aparato é um conjunto de eletrodos, distribuídos nos vértices do tanque de experimentos, que permitem obter as medidas (longas séries de instantes de disparo) sem restringir os movimentos do peixe e até mesmo inferir a sua posição comparando as amplitudes em diferentes eletrodos, o que possibilita relacionar *a posteriori* os padrões de disparo ao comportamento do animal.

Aplicando pulsos artificiais, que imitam os pulsos de um peixe verdadeiro, a um dipolo com geometria semelhante à do órgão elétrico dos animais, podemos estimular um peixe com padrões de intervalos entre pulsos provenientes de diferentes distribuições: aleatórias, intervalos gravados previamente do próprio ou de outro peixe, sequências manipuladas para repetir determinados trechos reais intercalados com trechos aleatórios, etc. As sequências de estímulo e de resposta são armazenadas e utilizadas posteriormente para calcular a informação mútua média entre os sinais. Também podemos detectar, em tempo real, os pulsos do peixe em um dos aquários e estimular, o peixe de outro aquário e vice-versa. Utilizamos métodos de análise linear e não linear tradicionais, assim como ferramentas da Teoria da Informação que nos permitem inferir o fluxo de informação trocada entre os peixes através de seus padrões elétricos.

Neste projeto, pretendemos ampliar estes estudos para relacionar os padrões elétricos ao comportamento social dos animais e a sua interação com o meio ambiente em três principais direções: (a) realizar experimentos sistemáticos para procurar encontrar os padrões usados na comunicação entre os peixes; (b) introduzir alterações nas amplitudes dos pulsos de estímulo para simular situações mais realistas como aproximação e afastamento do “peixe-estímulo”; (c) estudar alterações nos padrões de comportamento elétrico dos peixes devidas à alterações no meio ambiente como, por exemplo, a presença de impurezas minerais na água.

## Sumário

<b>1 - Introdução</b>	<b>4</b>
<b>2 - Metodologia</b>	<b>6</b>
<b>2.1 - Animais utilizados nos experimentos</b>	<b>6</b>
<b>2.2 – Métodos de Análise Tradicionais e Teoria da Informação</b>	<b>8</b>
<b>2.3 – Aparato experimental</b>	<b>11</b>
<b>2.4 – Experimentos e análise de dados</b>	<b>15</b>
<b>3 - Eletrocomunicação em <i>Gymnotus carapo</i></b>	
<b>resultados preliminares</b>	<b>16</b>
<b>3.1 – Experimento usando estímulo artificial unidirecional</b>	<b>16</b>
<b>3.2 – Dois peixes interagindo remotamente por computador</b>	<b>17</b>
<b>4 – Proposta de Trabalho</b>	<b>19</b>
<b>5 - Cronograma de execução</b>	<b>20</b>
<b>6 - Referências</b>	<b>21</b>

# 1 - Introdução

Ao longo da história, diversos modelos têm sido utilizados no estudo do processamento de informação em redes neurais biológicas. Um desses modelos, que possui características peculiarmente interessantes e, por isso, tem sido muito intensamente estudado, é o sistema sensorial dos peixes elétricos de campo fraco (Bullock, 1999). Estes peixes utilizam um órgão elétrico (OE) especializado para produzir um campo elétrico pulsado ao redor de seu corpo. Objetos que estejam dentro deste campo alteram a corrente induzida em órgãos eletroreceptores que se distribuem por toda a epiderme do peixe. Desta maneira, o peixe constrói uma imagem elétrica de suas vizinhanças (Caputi e Budelli, 1995) e pode se locomover em condições precárias de iluminação, ter hábitos noturnos ou habitar águas turvas. Este processo de análise da região ao redor do peixe pela monitoração de um campo auto-produzido é chamado de eletrolocalização (Von der Emde, 1999). Além da eletrolocalização os peixes também utilizam seus órgãos elétricos para eletrocomunicação, quando se comunicam socialmente, identificam o sexo e o tamanho dos vizinhos e resolvem disputas territoriais (DeCoursey, 1993).

Com base na descarga (DOE ou “EOD” do termo inglês *Electric Organ Discharge*) de seus OE, os peixes elétricos podem ser classificados como pulsadores ou onduladores. Os pulsadores produzem uma descarga curta semelhante a um pulso, a intervalos relativamente longos e irregulares. Dependendo da espécie, um pulsador descarregará seu órgão elétrico desde poucas vezes por minuto até mais de 80 por segundo. Os onduladores descarregam numa frequência constante para produzir um campo elétrico de tipo semelhante à onda senoidal. Nos onduladores a regularidade dos intervalos de descarga é notável; é suficientemente estável para ser o mais acurado dos relógios biológicos, em alguns casos a precisão dos pulsos chega a fração de microssegundo (Moortgat *et al.*, 1998). Dependendo da espécie, um ondulador descarregará cerca desde de 100 vezes por segundo até mais de 1.800 por segundo.

A eletrolocalização e a eletrocomunicação são mecanismos extremamente complicados, principalmente devido ao processamento de uma enorme quantidade de informação sensorial espaço-temporal pelo sistema nervoso do animal. Entretanto, o sinal elétrico produzido pelos peixes é fácil de ser detectado. São pouquíssimos os sistemas nervosos que permitem com uma medida simples e não invasiva acessar um sinal produzido por um sub-sistema interno complexo e altamente especializado. Entretanto, estudar a eletrocomunicação e sua relação com o comportamento social de peixes elétricos interagindo em tempo real é uma tarefa bem difícil, principalmente devido aos problemas relacionados com a separação das descargas dos peixes quando estes se movem livremente (Westby, 1975).

Por este motivo, na maioria dos trabalhos encontrados na literatura em que se observa a resposta do peixe a estímulos elétricos, geralmente o peixe tem seus movimentos drasticamente restritos e o protocolo de estímulo é sempre unidirecional: padrões periódicos ou séries de dados gravadas previamente do próprio peixe ou de outros são apresentados para o peixe e este não exerce nenhuma interferência nos estímulos. Estas técnicas, embora muito úteis para estudar diversos comportamentos relacionados à eletrolocalização, não são adequadas para o estudo de estratégias de comunicação.

Durante a execução de um projeto de mestrado nosso trabalho consistiu em desenvolver maneiras de estudar o comportamento dos peixes utilizando estímulos mais complexos (produzidos com a utilização de técnicas em tempo real), que se aproximassem mais daqueles à que os animais são submetidos durante seu comportamento normal e aplicar técnicas sistemáticas para quantificar a relação entre o estímulo e a resposta. Para isso, tivemos que desenvolver uma série de equipamentos que permitissem medir os sinais do peixe sem perturbá-lo enquanto este nadava livremente em um tanque enquanto outros equipamentos implementados permitiram estudar a interação entre dois peixes em tempo real. Paralelamente desenvolvemos uma série de programas de análise de dados baseados na aplicação de técnicas da Teoria da Informação.

A Teoria da Informação (Shannon, 1948; Borst e Theunissen, 1999) é uma especialização da teoria matemática da probabilidade aplicada ao estudo da transmissão de informação em sistemas de comunicação e constitui atualmente um método bastante rigoroso de quantificar a informação que transita em um sistema nervoso apenas observando os padrões elétricos em longas séries de dados. Em nosso caso, uma das grandes vantagens, é que na Teoria da Informação não é necessário fazer nenhuma afirmação *a priori* sobre a relevância ou sobre o significado dos padrões observados, nem mesmo sobre a natureza do código neural (Chacron, 2006).

O rigor da Teoria da Informação vem de medir a precisão da transferência de informação, determinando a distribuição de probabilidades de resposta dado um particular sinal de entrada, ou estímulo. Assim, podemos saber exatamente quanto do estímulo está, de alguma maneira, presente na resposta. Em redes neurais, a Teoria da Informação pode ser usada para quantificar precisamente a confiabilidade das funções de estímulo-resposta e sua utilidade tem sido reconhecida desde o início de seu desenvolvimento (Borst e Theunissen, 1999).

Circuitos nervosos envolvidos em processamento sensorial podem ser considerados como paradigmas para a aplicação da Teoria da Informação, uma vez que o significado dos sinais elétricos é conhecido, pelo menos de maneira aproximada, no nível sensorial. Assim, a aplicação da Teoria da Informação ao estudo do comportamento de peixes elétricos estimulados por sinais complexos, que iniciamos no mestrado, tem um grande potencial de trazer progressos para a compreensão das estratégias e dos padrões utilizados para a eletrocomunicação e suas aplicações em outras áreas.

## 2 - Metodologia

### 2.1 - Animais utilizados nos experimentos

Os animais utilizados nesse trabalho são adquiridos de coletores/pescadores que os comercializam na feira de Guarulhos, CECAP. Trabalhamos com peixes da espécie *Gymnotus carapo* (popularmente conhecidos como “tuvira”), com tamanho entre 15 cm e 25 cm, mantidos separadamente em aquários com oxigenação permanente e que são limpos e têm sua água trocada a cada 2 semanas. Os animais são alimentados 2 vezes por semana com um cardápio variado de alimento vivo, que consiste de pequenos peixes (lips), minhocas, artêmias, tenébrios ou insetos.

Os peixes da espécie *Gymnotus carapo* foram escolhidos para este trabalho por serem facilmente encontrados em várias regiões do estado de São Paulo e por produzirem seus pulsos elétricos a uma taxa relativamente baixa (~50 Hz), o que facilitou o desenvolvimento do aparato para a aquisição de dados e a interface entre o peixe e computador que pretendíamos estabelecer.

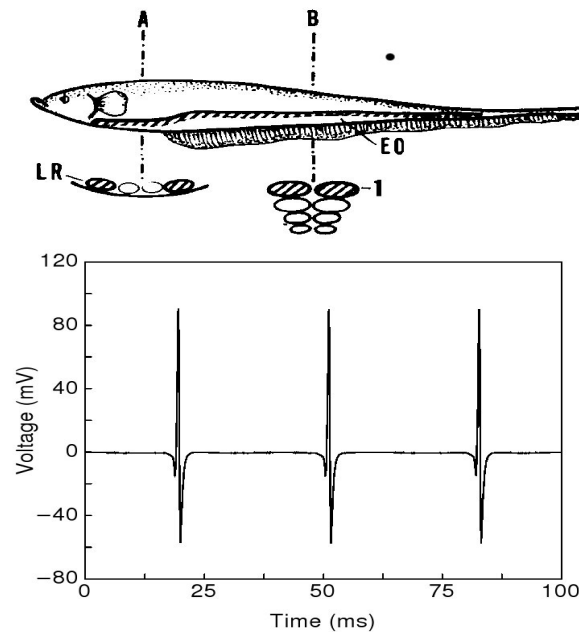
O *Gymnotus carapo*, como todos os peixes elétricos de água doce do Novo Mundo, pertence a subordem Gymnotodei da ordem Cypriniformes. Aparentemente, todos os membros da subordem são elétricos (produzem impulsos elétricos). Os gimnotóides são delgados e alongados, não possuem nadadeira dorsal mas tem uma nadadeira anal muito longa, lembrando a lâmina de uma faca pontuda, daí muitas vezes serem popularmente chamados de “peixes-faca”. Um exemplar típico de *Gymnotus carapo* é mostrado na figura 1. É um peixe que produz pulsos a frequência média de ~50 Hz com amplitude de ~1V a 2V (Caputi, 1999), por isso são muitas vezes chamados de peixes elétricos de “campo fraco”, e pode atingir mais de 45cm de comprimento. Alimenta-se de invertebrados e também de peixes de vários centímetros de comprimento, inclusive da própria espécie (Bullock et al., 2006).



**Figura 1** – Peixe elétrico de “campo fraco” *Gymnotus carapo*.

O comportamento elétrico de *G. carapo* tem atraído a atenção de pesquisadores a muito tempo (Faraday, 1839; Bennett e Grundfest, 1959; Santana *et al.*, 2001). A descarga elétrica é produzida por um agregado de tecidos especializados, que constituem o órgão elétrico. O comportamento eletromagnético do OE (Baffa e Corrêa, 1992) que em algumas espécies pode descarregar a mais de 1800Hz tem sido um intenso objeto de estudo. Em *Gymnotus*, o OE é formado por neurônios especializados

conhecidos como eletrócitos. Os eletrócitos estão, geralmente, entre as maiores células do animal e podem ser em forma de fita, disco ou fuso (Bullock *et al.*, 2006). Frequentemente estão dispostos em pilhas, com todas as células orientadas no mesmo sentido. Esta disposição é bastante comum e parece ser um resultado de evolução convergente para permitir uma produção máxima de voltagem pelo órgão (no caso dos peixes elétricos “fortes” como a enguia elétrica). Na figura 2 estão representados o órgão elétrico de *G. carapo* e uma série temporal típica de uma medida de seu sinal elétrico.



**Figura 2** – Superior: o órgão elétrico (EO) de *Gymnotus carapo* possui duas partes. A parte anterior ou abdominal (corte A) é composta por duas colunas de eletrócitos arranjadas bilateralmente (LR). A parte caudal (corte B) é composta por quatro colunas de eletrócitos. Eletrócitos duplamente inervados (hachurados no desenho) ocorrem em LR (anterior) e na coluna 1 (caudal). Adaptada de Trujillo-Cenóz *et al.*, 1984. Inferior: série temporal com descargas elétricas (DOEs) de *G. carapo* medidas na água com o eletrodo positivo colocado próximo a cabeça do peixe e o eletrodo negativo próximo da cauda - o pulso produzido é trifásico. Adaptada de Capurro e Malta, 2004.

*Gymnotus carapo* é um pulsador e, como tal, possui uma considerável amplitude para variar a taxa de descarga. Quando o animal está ativo, alimentando-se, é perturbado, ou de outro modo excitado, ele podem aumentar a taxa de descarga em várias centenas por cento. Uma razão possível para o aumento dessa taxa associada ao estímulo, é que o peixe utiliza seu órgão elétrico para interrogar seu ambiente mais frequentemente de forma a obter a informação necessária à sobrevivência e muitas vezes é chamada de *novelty response*, em inglês (Caputi *et al.*, 2002).

O que permite aos peixes elétricos fracos utilizarem o campo elétrico pulsado produzido pelos seus próprios OE para localizar objetos em sua vizinhança e para se comunicar é a presença de uma enorme quantidade de sensores de campo elétrico (eletroreceptores) espalhados pelo corpo do peixe (Castelló *et al.*, 2000). Em *Gymnotus carapo* existe uma região em torno da mandíbula que apresenta a maior concentração de

eletroreceptores em todo o corpo do peixe, conforme mostrado na figura 4. A grande concentração de receptores (100 receptores/mm<sup>2</sup> em peixes de 10 cm de comprimento) em uma pequena região e outras semelhanças das imagens elétricas com o sistema visual humano levou a chamar esta região em torno da mandíbula do peixe de “fóvea elétrica”. Só que ao invés de depender de uma fonte externa, como a luz do sol, o mecanismo de produção de imagens elétricas a partir de um sinal auto-produzido é semelhante à ecolocalização utilizada pelos morcegos e recebe o nome de eletrolocalização.

As descargas do órgão elétrico também têm um importante papel na comunicação social. A identificação do sexo e da espécie frequentemente baseia-se nas características das descargas típicas da espécie e do sexo e o estado comportamental de um animal frequentemente se reflete nos modos particulares da atividade elétrica. Em *Gymnotus carapo*, um indivíduo dominante assinala suas ameaças e intenções de ataque por característicos aumentos na taxa dos DOEs e por breves interrupções. O indivíduo dominado assinala sua submissão por um período de interrupção, podendo silenciar seu órgão elétrico desde alguns segundos a minutos (Bullock *et al.*, 2006).

Quando dois peixes elétricos de uma mesma espécie se aproximam pode ocorrer uma séria deterioração de sua capacidade de sensoriamento elétrico devido à interferência entre seus sinais elétricos. Para evitar essa interferência e permitir a concentração de vários peixes em uma mesma vizinhança cada peixe altera a frequência de seus pulsos para que eles não se sobreponham (Takizawa *et al.*, 1999; Capurro e Malta, 2004; Tan *et al.*, 2005). Este mecanismo, que ocorre automaticamente, é conhecido como “resposta para evitar interferência” (JAR - do inglês *Jamming-Avoidance Response*), e em vertebrados é provavelmente um dos comportamentos mais bem compreendidos em nível neural (Fortune *et al.*, 2006).

Os peixes pulsadores sul-americanos como *G. carapo* respondem tipicamente à interferência causada pela DOE de um peixe vizinho com uma aceleração ou, menos frequentemente, uma desaceleração na taxa de repetição dos pulsos. Podem manter uma taxa diferente e assim reduzir a chance de pulsos coincidentes. Apenas uma série de várias coincidências consecutivas é grave em termos de prejuízo na detecção de objetos, e basta manter os pulsos estranhos a poucos milissegundos da coincidência.

## 2.2 – Métodos de análise tradicionais e Teoria da Informação

Assim como fizemos durante a execução do projeto de mestrado, em que além de métodos mais tradicionais de análise das séries de intervalos entre disparos, tais como análises estatísticas, correlações, espectros de potência (normal ou ao longo do tempo), reconstrução de atratores dinâmicos e cálculos de expoentes de Lyapunov, iremos também passar a utilizar análise com wavelets para decompor os sinais elétricos produzidos pelos peixes em suas principais componentes e estudar como estas componentes se alteram ao longo do tempo em função dos estímulos ou do comportamento dos animais.

Utilizaremos ferramentas da Teoria da Informação para quantificar a transmissão de informação entre dois peixes elétricos interagindo, assim como quanta informação um peixe é capaz de absorver de um sinal complexo artificial (descargas aleatórias geradas artificialmente por computador). Dessa maneira, poderemos estudar, de modo indireto, algumas das possíveis estratégias que o sistema sensorial do peixe



utiliza para coletar as informações presentes no meio ambiente e, de maneira mais direta, quais os padrões que estes animais usam para se comunicar. Como a Teoria da Informação é bastante arbitrária quanto ao processo de codificação de um sinal, exemplificamos brevemente a seguir o modo como codificamos os sinais dos peixes para obter sequências de eventos binários.

### 2.2.1 - Teoria da Informação e cálculo da informação mútua média entre dois sinais

Na Teoria da Informação (Shannon, 1948; Borst e Theunissen, 1999, Rabinovich *et al.*, 2002), a informação associada a um evento é definida como sendo  $\log_2(1/P(x))$ . É utilizado log na base 2 porque normalmente é usada a unidade arbitrária bits (0 ou 1) e a função log porque é a única função matemática capaz de transformar multiplicação de probabilidades em somas de informação como é necessário para a teoria.

Quando um evento tem uma baixa probabilidade de ocorrer, a informação sobre o evento é maior que a informação de um evento que possui maior probabilidade de ocorrer. Assumindo que tenhamos uma série de eventos  $x$  pertencente ao conjunto  $(sinal_1, sinal_2, \dots, sinal_n) = X$ . A entropia é definida como o valor médio da informação de todos os eventos, e é expressa por

$$H(X) = - \sum_x P(x) \log_2 P(x)$$

$H(X)$  é grande se o sistema possuir muitos estados com a mesma probabilidade de ocorrência (alta variabilidade), por outro lado será nula se e somente se o sistema permanecer em um único estado. A entropia é assim sempre maior ou igual a zero.

Um neurônio ou rede neural fornece alguma informação sobre um estímulo se sua resposta  $x$  for correlacionada de alguma maneira com mudanças no estímulo. Se o estímulo não mudar no decorrer do tempo (sinais periódicos = estímulos constantes) não há transmissão de informação porque a informação contida no estímulo é nula. A Informação Mútua é um método de determinar se a variabilidade da resposta é correlacionada com a variabilidade do estímulo. Para calcular a informação mútua é necessário comparar as diversas respostas devido à aplicação de diferentes estímulos. Cada estímulo precisa ser apresentado um número razoavelmente grande de vezes de modo a tornar a estatística relevante. A informação  $i$  entre um estímulo  $s$  pertencente a  $S$  (conjunto de todos os estímulos possíveis) e uma resposta  $r$  pertencente a  $R$  (conjunto de todas as respostas possíveis) é definida como:

$$i(s,r) = \log_2 \left( \frac{p(s,r)}{p(s)p(r)} \right),$$

onde  $p(s,r)$  é a probabilidade conjunta de ocorrerem o estímulo  $s$  e a resposta  $r$ . Se os processos forem estatisticamente independentes,  $p(s,r) = p(s)p(r)$  e a informação mútua é nula. A Informação Mútua Média (IMM) é a média da informação contida em todos os possíveis eventos:

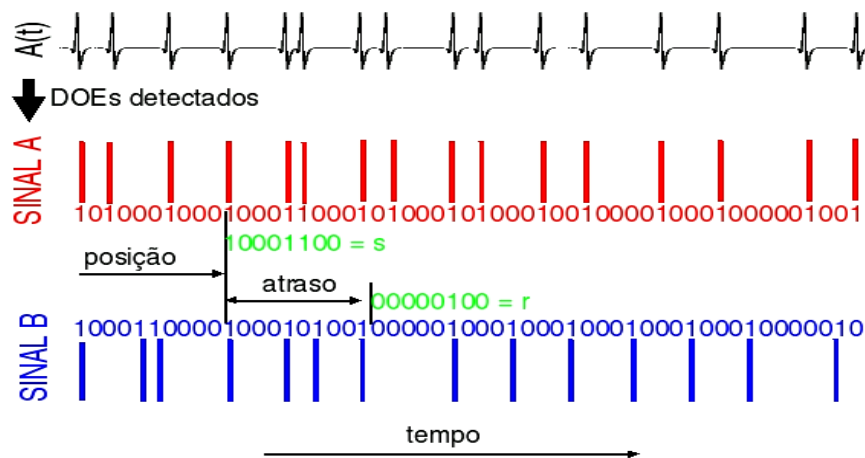
$$IMM(S,R) = \sum_{s,r} p(s,r) i(s,r),$$

que também pode ser expressa por

$$IMM(S,R) = H(R) - H(R|S),$$

onde  $H(R|S)$  é a entropia condicional da resposta em função do estímulo. A Informação Mútua Média é sempre maior ou igual a zero. A IMM é simétrica, ou seja  $IMM(S,R) = IMM(R,S)$ , ela apenas mostra a informação que os sinais tem em comum sem indicar qual a direção em que a informação se propaga.

Na figura 3 mostramos um exemplo de obtenção dos pares (s,r) a partir das séries temporais de DOEs  $A(t)$  e  $B(t)$ , medidas simultaneamente em dois animais interagentes para o posterior cálculo da IMM.



**Figura 3** - Exemplo de um pequeno trecho do comportamento de disparos de dois peixes elétricos e o esquema utilizado para codificar a posição das DOEs. SINAL A e SINAL B correspondem aos DOEs detectados nos dois animais, respectivamente. As séries de disparos dos dois animais  $A(t)$ ,  $B(t)$  são divididas em um grande número de pequenos intervalos de igual duração  $\Delta t$  e um bit é atribuído a cada um desses intervalos. As séries de disparos são então transformadas em longas *strings* de *bits* 0 ou 1: se dentro de um intervalo ocorreu um disparo um *bit* 1 é atribuído àquela posição, caso contrário, um *bit* 0 é atribuído. Partindo do início das duas *strings* (posição = 0) uma “palavra” de número arbitrário de *bits* (no exemplo = 8 bits) é extraído do SINAL A (estímulo = s) e o mesmo número de *bits* (resposta = r) é extraído do SINAL B pulando um intervalo de atraso (arbitrariamente escolhido para permitir uma relação de causalidade). Incrementando-se sucessivamente o contador posição obtém um grande conjunto de pares (s,r) que é usado para calcular a IMM entre os sinais.  $\Delta t$  e o número de *bits* usado em s e r devem ser escolhidos de modo a maximizar a entropia dos conjuntos  $\{s\}$  e  $\{r\}$ .

Para verificar a significância estatística de nossos resultados do cálculo da IMM utilizamos o método dos surrogados (Theiler *et al.*, 1992).

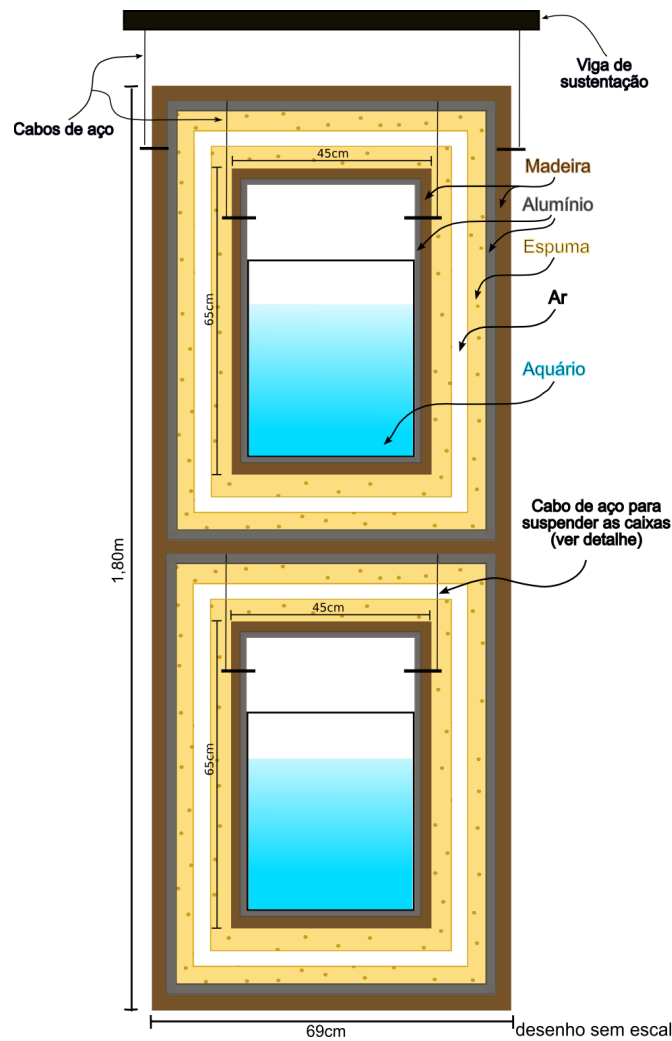
## 2.3 – Aparato experimental

O aparato consiste de 2 aquários de vidro de (40 x 40 x 44) cm dispostos verticalmente em uma estrutura de madeira (figura 4). Cada aquário fica dentro de uma caixa de 45cm construída com compensado (virola) de 20mm de espessura, revestida internamente de chapas de alumínio de 0,3mm formando uma blindagem eletromagnética (gaiola de Faraday). Estas caixas que contém os aquários, por sua vez, foram suspensas por cabos de aço a uma caixa externa mais larga (69cm), também construída com compensado (virola) de 20mm de espessura e revestida internamente de chapas de alumínio de 0,3mm formando uma segunda gaiola de Faraday. Entre a caixa externa e as internas há 2 camadas de espuma acústica de 3cm com um intervalo de 4cm entre elas. A espuma serve para isolar o peixe de possíveis ruídos sonoros no ambiente e o espaço entre as espumas serve para impedir a propagação de ondas mecânicas (vibração) da caixa externa para as internas.

Essa caixa externa foi suspensa por cabos de aço presos à vigas no teto do laboratório. Os cabos de aço estão presos à pedaços de barra roscada parafusadas nas paredes da caixa de compensado (figura 8b). Esta foi a melhor maneira que encontramos para isolar os aquários das vibrações do prédio do laboratório e permitir medições das DOEs em dias normais, quando há pessoas trabalhando no laboratório e circulando pelo prédio.

Para detectar os pulsos dos peixes utilizamos 8 eletrodos de aço inóx (para não haver oxidação em contato com a água) que foram introduzidos pela parede de silicone vedante: 4 na base do aquário sendo um em cada vértice e mais 4 eletrodos colocados a 40cm acima destes, ou seja, a poucos milímetros da superfície da água (o aquário é preenchido com água até que esta adquira um formato aproximadamente cúbico). Um dos eletrodos da base foi escolhido como referência, e o sinal dos outros 7 eletrodos é amplificado diferencialmente (ganho ~100) em relação á referência, formando assim, 7 dipolos sensores. Quanto mais perto de um dos eletrodos o peixe estiver, maior a amplitude do sinal medida por ele.

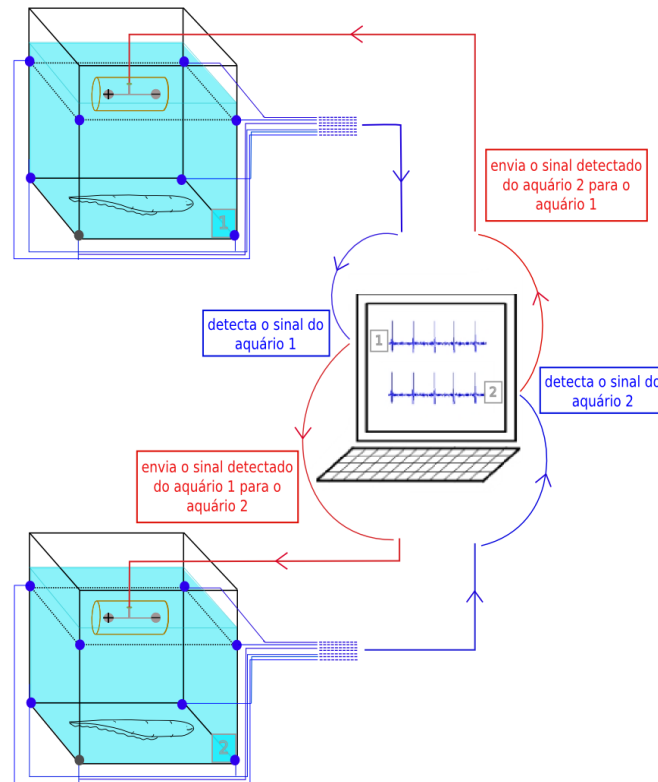
Como o sinal do peixe tem uma fase negativa e outra positiva com amplitude diferente, é possível medir estas amplitudes e determinar se é a cabeça ou a cauda que está mais próxima do eletrodo. Além disso, comparando as amplitudes relativas entre os diversos dipolos podemos determinar nas proximidades de qual eletrodo o peixe se encontra. Um computador com o *software DasyLab* (Dasytech, Alemanha) foi usado para medir os sinais dos diversos dipolos e detectar os instantes dos pulsos dos peixes nos dois aquários.



**Figura 4** – Aparato experimental: os aquários estão dentro de caixas de compensado de madeira, revestido de lâminas de alumínio que promovem isolamento eletromagnético (gaiola de Faraday). Essas caixas foram suspensas por cabos de aço dentro de uma caixa maior. Duas camadas de espuma de 3cm cada com um intervalo de 4cm entre elas foram utilizadas para isolamento acústico e mecânico. A caixa maior foi também suspensa por cabos de aço fixados a uma viga no teto do laboratório, reduzindo a passagem de vibrações do prédio que podem interferir em nossa tomada de dados.

Devido à agressividade e territorialismo do *Gymnotus carapo*, evitamos colocar dois peixes soltos em um mesmo aquário para não machucá-los. Além disso, se colocarmos 2 peixes em um mesmo aquário teremos uma grande dificuldade para separar os sinais dos peixes, sobretudo devido ao movimento destes. Assim, para estudar o comportamento do peixe na presença de sinais de outros peixes, criamos um “peixe artificial”, que é um dipolo móvel, de 15cm de comprimento, montado dentro de um segmento de tubo de PVC para imitar a geometria do órgão elétrico de um peixe médio.

Este dipolo é estimulado pela saída de um conversor digital-analógico controlado por um segundo computador dedicado à detecção em tempo real e produção de estímulo, onde um programa de controle, escrito em linguagem C, produz os padrões de estímulo em tempo real (Figura 5).

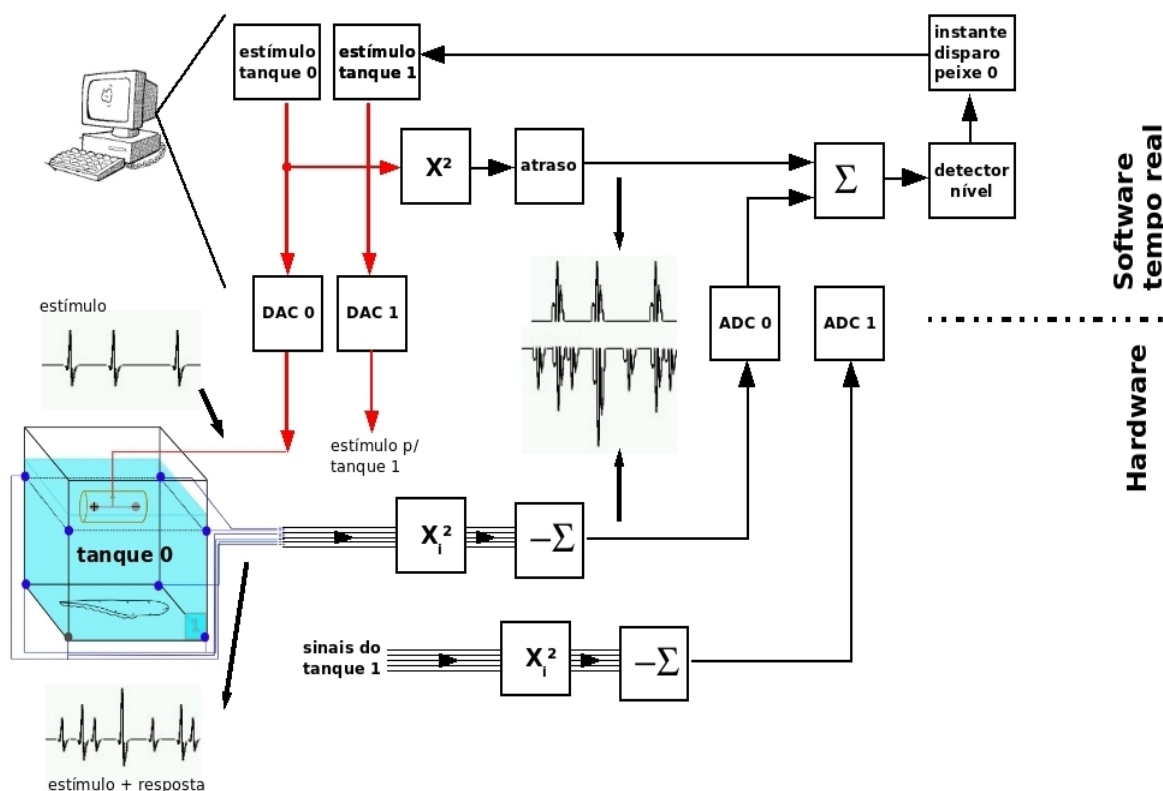


**Figura 5** – Aparato usado para conectar dois

peixes: os pulsos de um peixe são detectados em tempo real em um dos aquários e a cada pulso um estímulo de amplitude constante é produzido no outro aquário e vice-versa por um peixe falso (dipolo móvel, de 15 cm de comprimento, montado dentro de um segmento de tubo de PVC para imitar a geometria do órgão elétrico de um peixe médio). Como o dipolo está sempre na mesma posição, podemos medir sua contribuição para o sinal de cada eletrodo, e subtraí-la *a posteriori*, separando o sinal de estímulo do sinal de resposta do peixe.

Com nosso arranjo de 8 eletrodos distribuídos nos vértices do cubo de água formado dentro do tanque de medidas, obtemos o sinal dos disparos do peixe para qualquer posição deste dentro do tanque. A amplificação do sinal de disparo do peixe é feita de modo diferencial – usamos um dos eletrodos como referência e amplificamos o sinal de cada um dos outro 7 eletrodos em relação ao de referência. O circuito baseia-se no amplificador operacional de baixo ruído para instrumentação LM 308 (*Linear Technology Datasheet*, 2000). O ganho do circuito pode ser ajustado de modo a adequar a amplitude dos sinais medidos ao sistema ADC de aquisição de dados.

Os experimentos que envolvem a conexão de dois peixes foram viabilizados com a construção de um equipamento que processa os sinais dos dois tanques parte através de eletrônica analógica, parte através de *software* em tempo real. A conexão entre o *hardware* analógico e o programa em tempo real é feita através de uma placa interface *Digidata 1200B* (Axon Inc.) que possui dois conversores digital analógicos (DACs) e 16 conversores analógico-digitais (ADCs), dos quais apenas dois são usados para melhorar a velocidade do programa. O diagrama em blocos parcial dos circuitos eletrônicos e do programa de aquisição/controle em tempo real do experimento é mostrado na figura 6.



**Figura 6** – Diagrama em blocos parcial da circuitaria analógica e do programa de aquisição em tempo real para a conexão de dois peixes. O estímulo artificial para o tanque 0 é produzido por computador (DAC 0) e aparece misturado com os pulsos do peixe real nos diversos eletrodos. Um circuito analógico eleva os sinais ao quadrado, soma os sinais dos diversos canais e aplica este sinal obtido a uma das entradas de uma placa ADC do computador. O programa em tempo real é capaz de eliminar os impulsos devido ao estímulo gerado subtraindo deste sinal o correspondente ao estímulo artificial atrasado. Os pulsos do peixe verdadeiro são detectados por simples comparação com um nível pré-determinado e usados para estimular o tanque onde está o peixe 1. O mesmo ocorre para os estímulos introduzidos no tanque 1.

Quando o programa detecta que o peixe do tanque 1 disparou, um estímulo para o tanque 0 é produzido (através do DAC 0). Este estímulo é aplicado ao dipolo dentro do tanque 0 e depois de um atraso de alguns microssegundos (tempo de propagação do sinal na água desde o dipolo até os sensores) este sinal aparece nos eletrodos somado ao sinal dos pulsos do peixe verdadeiro. Esse sinal composto, medido nos 7 eletrodos, é amplificado diferencialmente, elevado ao quadrado, somado e invertido analógicamente. O computador lê esse sinal processado através do ADC 0 e o soma com o sinal de estímulo gerado previamente elevado ao quadrado e atrasado para que os impulsos do estímulo apareçam exatamente no mesmo instante nos dois sinais mas com amplitudes contrárias. Somando-se os sinais é possível eliminar a interferência do estímulo e recuperar apenas os pulsos do peixe verdadeiro, mesmo quando ocorre uma sobreposição destes com os do estímulo. Os instantes de disparo do peixe verdadeiro são detectados através de um comparador de nível e são usados para produzir os pulsos

de estímulo para o tanque 1. O mesmo algoritmo é aplicado aos sinais do tanque 1 que geram os impulsos para o peixe do tanque 0.

## 2.4 – Experimentos e análise de dados

Durante nossos experimentos, séries temporais longas dos sinais dos DOEs de um ou dois peixes são digitalizadas (taxa de digitalização = 50KHz), os instantes de disparo são detectados (com resolução de 0.1 ms) e armazenados em disco, por um computador de aquisição de dados (*DasyLab*, *Dasytech*, Alemanha). No caso de sinais de dois peixes gravados simultaneamente, um programa em C++ faz o cálculo da informação mútua média a partir dos arquivos armazenados conforme descrito a seguir (e exemplificado na figura 3).

A série temporal dos disparos é inicialmente dividida em um grande número de pequenos intervalos de igual duração  $\Delta t$  e é então transformada em uma longa string de *bits* 0 ou 1 (se dentro de um intervalo  $\Delta t$  ocorreu um disparo, um *bit* 1 é atribuído àquela posição, caso contrário, um *bit* 0 é atribuído). Partindo do início das duas *strings* (*posição* = 0) um determinado número de *bits* é extraído do SINAL A e atribuído ao elemento  $s(\textit{posição})$  do conjunto  $\{s\}$ . Saltando um intervalo de *atraso* (arbitrariamente fixado para permitir uma relação de causalidade) o mesmo número de *bits* é extraído do SINAL B e atribuído ao elemento  $r(\textit{posição})$  do conjunto  $\{r\}$ . Incrementando-se sucessivamente o contador *posição* obtém-se um grande conjunto de pares  $(s,r)$  que é usado para calcular a IMM entre os sinais.  $\Delta t$  e o número de *bits* usados em  $s$  e  $r$  são arbitrários e serão escolhidos de modo a maximizar a entropia dos conjuntos  $\{s\}$  e  $\{r\}$ .

A escolha do número de *bits* da palavra  $(s,r)$  deve ser suficientemente grande para comportar palavras com o tamanho necessário para capturar toda a informação da mensagem. Em nosso caso, tentamos palavras com diversos números de *bits* e obtivemos resultados coerentes e semelhantes.

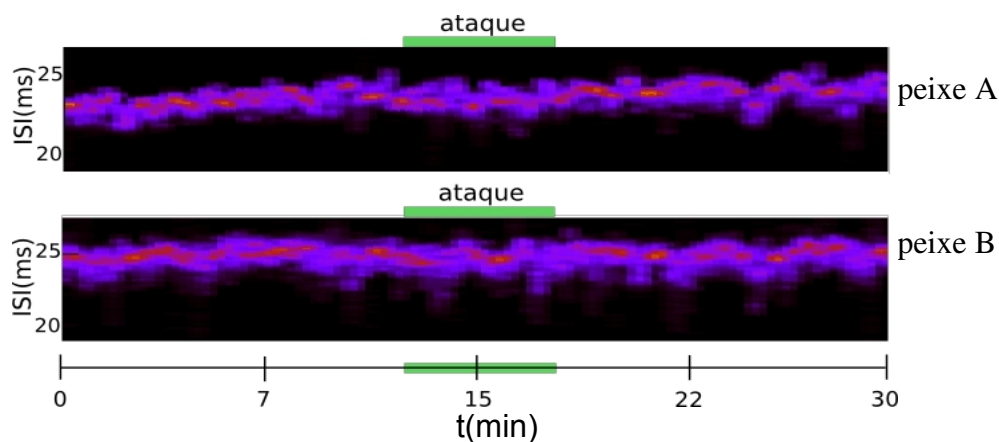
Obtemos o valor da IMM entre os sinais usando todos os pares  $(s,r)$  dentro de uma janela de 40 segundos que começa no início das séries. O início dessa janela é então deslocado de 20 segundos e novo cálculo de IMM é obtido e, assim, sucessivamente até o final das séries de dados. Dessa maneira, obtemos como varia a IMM a cada 20 segundos para este intervalo de atraso entre os sinais. Para verificarmos a importância do atraso (latência da resposta) para o valor da IMM, repetimos o cálculo para diversos atrasos entre -5s e +5s. Os resultados são apresentados em gráficos em que plotamos o valor da IMM (em código de cores) em função do tempo do experimento e do parâmetro atraso entre os sinais.

A teoria da informação nada afirma sobre a direção do fluxo de informação, entretanto o parâmetro atraso que introduzimos permite associarmos os eventos em uma seqüência causal em que a direção de propagação da informação emerge naturalmente.

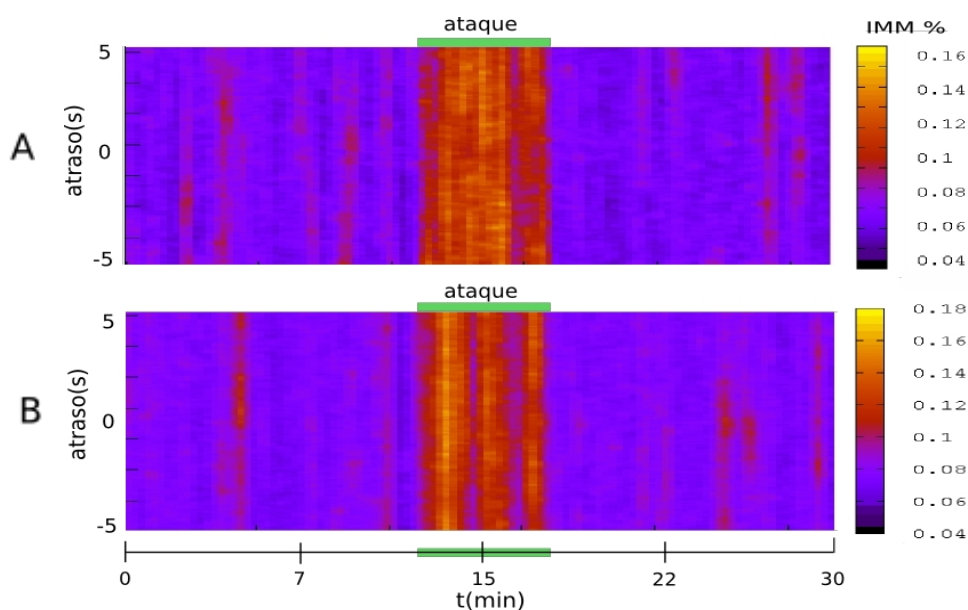
### 3 - Eletrocomunicação em *Gymnotus carapo* – resultados preliminares

#### 3.1 – Experimento usando estímulo artificial unidirecional

Neste experimento introduzimos no padrão gravado de um peixe isolado explorando o aquário, 10 minutos do padrão de um peixe grande que agredia um peixe menor. No histograma de ISIs no tempo (figura 7) no trecho correspondente a série de ataque, não se nota nenhuma característica que o faça diferente dos demais, entretanto, todos os peixes para os quais este estímulo foi apresentado 'reconheceram' os intervalos de agressão introduzidos, já que nossa análise apresentou picos na IMM exatamente nestas regiões (figura 8).



**Figura 7** – Histograma no tempo para dois peixes diferentes no qual foi introduzido um padrão de ataque (faixa verde) no meio da série de estímulos. Nesse trecho a série de ISIs não é diferente do restante, apesar da alta IMM nessa região.



**Figura 8** – IMM para a série de estímulos na qual foi introduzida um padrão de ataque (faixa verde). Há picos de IMM na região do ataque indicando que ambos os peixes 'reconheceram' o estímulo apresentado.

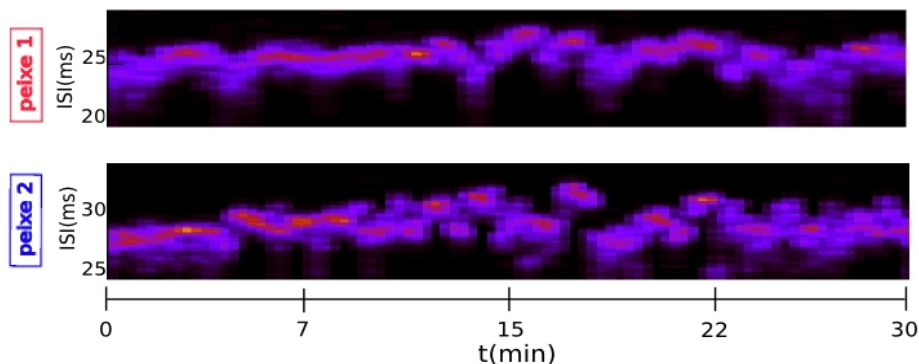


Assim, concluímos que há algo no padrão do estímulo que é reconhecido pelos diferentes peixes e que provoca a resposta destes, mas que não pode ser trivialmente observado em nenhuma das séries de ISIs. Nossa hipótese é que estes picos devem corresponder a padrões complexos usados na comunicação entre os peixes.

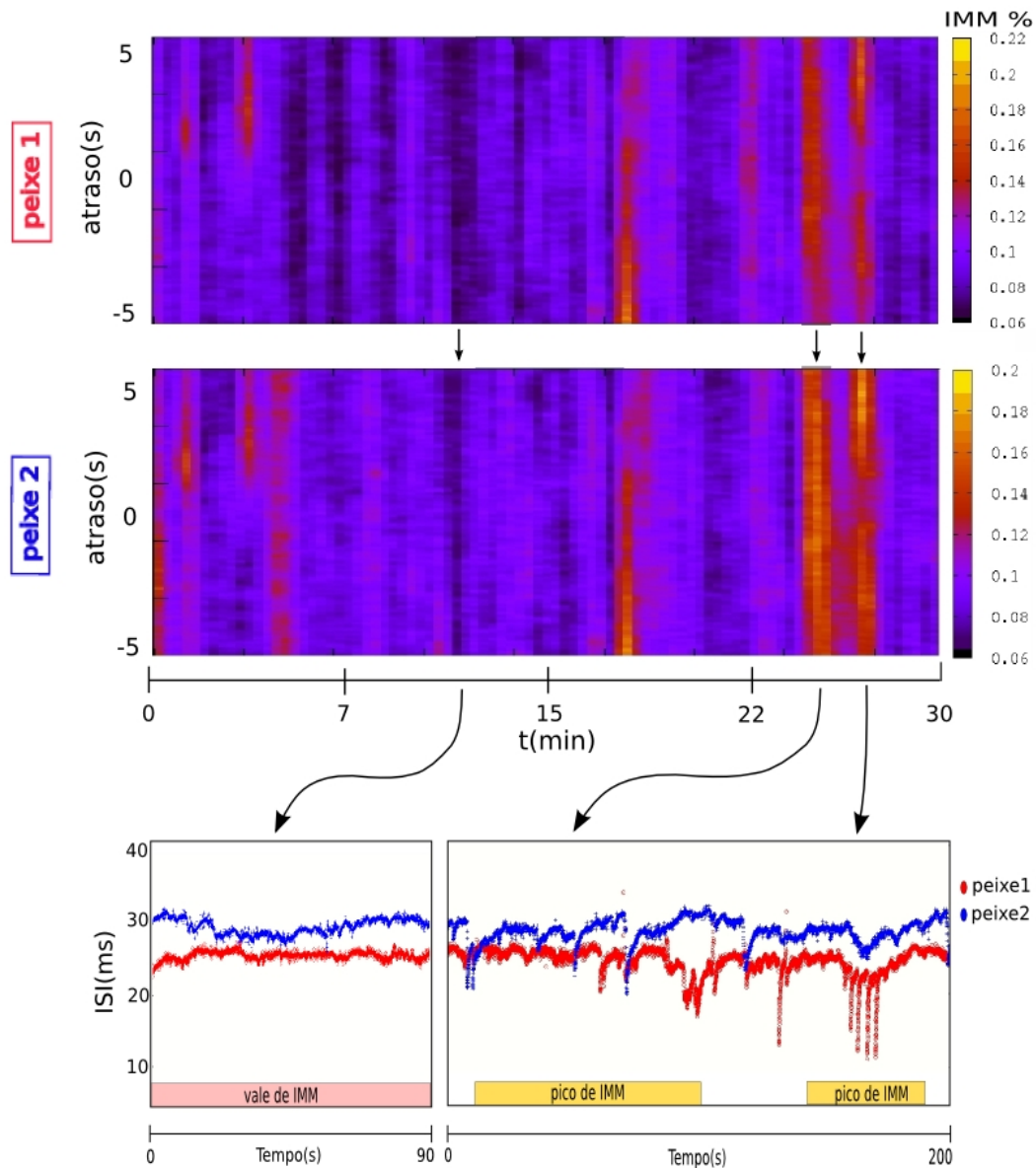
### 3.2 – Dois peixes interagindo remotamente por computador

Nestes experimentos dois peixes interagiram por 30 minutos através de dipolos estimulados por um computador onde um programa de controle foi desenvolvido para detectar os pulsos de um peixe e reproduzi-los no aquário do outro (seção 2.3). Durante esse período os dois peixes se moveram por todo o aquário dando preferência para a região em que o peixe falso estava. Novamente, sem haver nenhum padrão facilmente identificável na série de ISIs (figura 9), diversos picos de IMM são observados (figura 10). A única característica é que nesses trechos os ISIs apresentam uma variabilidade grande, ao passo que numa região com baixa IMM, os ISIs se comportam de maneira bem mais regular (figuras 9 e 10).

Podemos concluir, a partir desses resultados, que os peixes estão trocando algum tipo de informação relacionada à comunicação social que não provém dos mecanismos de JAR (Capurro *et al.*, 1998), já que verificamos que os picos persistem mesmo quando alteramos aleatoriamente os instantes de ocorrência dos disparos de um peixe em uma amplitude de 4 ms, o que anulava os efeitos do JAR.



**Figura 9** – Histograma no tempo de dois peixes conectados



**Figura 10** – IMM normalizada pela entropia dos dois peixes conectados (acima e no centro) e trechos da série de ISIs (abaixo) correspondentes a um vale de IMM (IMM baixa) e a picos de IMM. A variabilidade dos ISIs é maior para os trechos com IMM alta.

## 4 – Proposta de Trabalho:

Durante a execução deste projeto de doutoramento pretendemos continuar o estudo do sistema de eletrocomunicação do *Gymnotus carapo* iniciado no mestrado, de modo a explorar intensivamente o equipamento que desenvolvemos e as novas possibilidades que ele proporciona de realizar experimentos realistas com peixes elétricos sem restringir seus movimentos.

Assim, pretendemos utilizar as técnicas de construção de sequências de disparos artificiais (experimentos com interface unidirecional computador -> peixe), a conexão bidirecional entre dois peixes que interagem por computador e a aplicação da teoria da informação na análise de dados.

Nossa proposta consiste em estender nossos trabalhos principalmente em três direções:

- (a) realizar experimentos sistemáticos para procurar encontrar os padrões usados na comunicação entre os peixes;
- (b) introduzir alterações nas amplitudes dos pulsos de estímulo para simular situações mais realistas como aproximação e afastamento do “peixe-estímulo”;
- (c) estudar alterações nos padrões de comportamento elétrico dos peixes devidas à alterações no meio ambiente como, por exemplo, a presença de impurezas na água (minerais diversos).

## **5 - Cronograma de execução**

O cronograma proposto inicialmente para a execução deste projeto de doutoramento é:

### **1º ano:**

- cursar disciplinas para obter os créditos necessários para o doutoramento;
- preparação de um artigo para publicação com os resultados obtidos no mestrado;
- alterar o programa de controle em tempo real para incluir alterações na amplitude do estímulo para simular aproximações ou afastamentos do “peixe artificial”;
- realizar experimentos com sequências artificiais para estudar os efeitos de determinados trechos com padrões conhecidos (ataque, fuga, aproximação, afastamento, etc.);
- análise de dados;

### **2º ano:**

- cursar eventuais disciplinas que ainda sejam necessárias para o doutoramento;
- realizar experimentos com sequências artificiais para estudar os efeitos de determinados trechos com padrões conhecidos (ataque, fuga, aproximação, afastamento, etc.);
- realizar experimentos com dois peixes interagindo em tempo real;
- análise de dados;
- redação de eventuais trabalhos decorrentes da execução do projeto;

### **3º ano:**

- realizar experimentos com dois peixes interagindo em tempo real;
- realizar experimentos com peixes interagindo em um ambiente com impurezas na água;
- análise de dados;
- redação de eventuais trabalhos decorrentes da execução do projeto;
- redação e apresentação da tese de doutoramento.

## 6 - Referências

- Baffa, O., Côrrea, S. L. (1992): Magnetic and electric characteristics of the electric fish *Gymnotus carapo*. *Biophys. J.* **63**, 591-593.
- Bennet, M. V. L., Grundfest, H. (1959): Electrophysiology of electric organ in *Gymnotus carapo*. *J. Gen. Physiol.* **42**, 1067-1104.
- Borst, A. e Theunissen, F. E. (1999): Information theory and neural coding, *Nature Neurosci.* **2**, 947-957.
- Bullock, T. H. (1999): The future of research on electroreception and electrocommunication. *J. Exp. Biol.* **202**, 1455-1458.
- Bullock, T. H., Fernandes-Souza, N., Graf, W., Helligenberg, W., Langner, G., Meyer, D. L., Pimentel-Souza, F., Scheich, H., Viancour, T. A. (2006): Aspectos do uso da descarga do órgão elétrico e eletrorrecepção nos Gymnotoidei e outros peixes amazônicos. <http://www.icb.ufmg.br/lpf/1-11.html>, acessado em 03/04/2006.
- Capurro, A., Macadar, O., Perrone, R., Pakdaman, K. (1998): Computational model of the jamming avoidance response in the electric fish *Gymnotus carapo*. *BioSystems.* **48**, 21-27
- Capurro, A., Malta, C. P. (2004): Noise autocorrelation and jamming avoidance performance in pulse type electric fish. *Bull. Math. Biol.* **66**, 885-905.
- Caputi, A., Budelli, R. (1995): The electric image in weakly electric fish: I. A data-based model of waveform generation in *Gymnotus carapo*. *J. Comput. Neurosci.* **2**, 131-147.
- Caputi, A. A. (1999): The electric organ discharge of pulse gymnotiforms: the transformation of a simple impulse into a complex spatio-temporal electromotor pattern. *J. Exp. Biol.* **202**, 1229-1241.
- Caputi, A. A., Aguilera, P.A., Castelló, M. E. (2002): Probability and amplitude of novelty responses as a function of the change in contrast of the reafferent image in *G. Carapo*. *J. Exp. Biol.* **206**, 999-1010.
- Castelló, M. E., Aguilera, P.A., Trujillo-Cenóz, O., Caputi, A.A. (2000): Electroreception in *Gymnotus carapo*: pre-receptor processing and the distribution of electroreceptor types. *J. Exp. Biol.* **203**, 3279-3287.
- Chacron, M. J. (2006): Nonlinear information processing in a model sensory system. *J. Neurophysiol.*, Articles in Press. (February 22, 2006) doi:10.1152/jn.01296.2005.
- DeCoursey, P. J. (1993): Sensory perception and communication in electric fish. In *Tested studies for laboratory teaching*, vol. 5, (C.A. Goldman, P.L.Hauta, M.A. O'Donnell, S. E. Andrews, and R. van der Heiden, Editors). Proceedings of the 5<sup>th</sup> Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE). <http://www.zoo.utoronto.ca/able>.
- von der Emde, G. (1999): Active electrolocation of objects in weakly electric fish. *J. Exp. Biol.* **202**, 1205-1215.
- Faraday, M. (1839): Notice on the character and direction of the electric force of the gymnotus. *Phys. Trans. Royal Soc. Lond.* **129**, 1-12.
- Fortune, E. S., Rose, G. J., Kawasaki, M. (2006): Encoding and processing biologically relevant temporal information in electrosensory systems. *J. Comp. Physiol. A*, Articles in Press., DOI 10.1007/s00359-006-0102-0.

- Moortgat, K. T., Keller, C. H., Bullock, T. H., Sejnowski, T. J. (1998): Submicrosecond pacemaker precision is behaviorally modulated: the gymnotiform electromotor pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 4684-4689.
- Rabinovich, M. I., Pinto, R. D., Abarbanel, H. D. I., Tumer, E. , Stiesberg, G. , Huerta, R., and Selverston, A. I. (2002), Recovery of hidden information through synaptic dynamics, *Network: Comput. Neural Syst.* **13**, 487-501.
- Santana, U. J., Roque-da-Silva, A. C., Duarte, T. T., and Corrêa, S. A. L. (2001): Interference with the GABAergic system in the dorsolateral telencephalon and modulation of the electric organ discharge frequency in the weakly electric fish *Gymnotus carapo*. *J. Comp. Physiol. A* **187**, 925-933.
- Shannon, C. E. (1948): The mathematical theory of communication, *Bell Syst. Tech. J.* **27**, 379-423.
- Takizawa, Y., Rose, G. J., Kawasaki, M. (1999): Resolving competing theories for control of the jamming avoidance response: the role of amplitude modulations in electric organ discharge decelerations. *J. Exp. Biol.* **202**, 1377-1386.
- Tan, E. W., Nizar, J. M., Carrera-G, E., Fortune, E. S. (2005): Electrosensory interference in naturally occurring aggregates of a species of weakly electric fish, *Eigenmannia virescens*. *Behav. Brain Res.* **164**, 83-92.
- Theiler, J., Eubank, S., Longtin, A., Galdrikian, B., and Farmer, J. D. (1992) Testing for nonlinearity in time series: the method of surrogate data. *Physica D* **58**, 77-94.
- Trujillo-Cenóz, O., Echagüe, J. A., Macadar, O. (1984): Innervation pattern and electric organ discharge waveform in *Gymnotus carapo* (Teleostei; Gymnotiformes). *J. Neurobiol.* **15**, 273-281.
- Westby, G.W.M. (1975): Comparative studies of the aggressive behaviour of two Gymnotid electric fish (*Gymnotus carapo* and *Hypopomus artedi*). *Anim.Behav.* **23**, 192-213.

14 de novembro de 2008

Caroline G. Forlim  
Reynaldo D. Pinto