

Universidade de São Paulo
Instituto de Física de São Carlos
Departamento de Física e Informática

**Neurofisiologia em tempo real:
desenvolvimento de uma interface
entre tecido nervoso vivo e
computador usando processamento
paralelo.**

Gisele Strieder Philippsen

Orientador: Prof. Dr. Reynaldo Daniel Pinto
Co-orientador: Prof. Dr. Guilherme de Matos Sipahi

Projeto de Doutorado
em Física Computacional
apresentado à CPG do IFSC

São Carlos
2009

Neurofisiologia em tempo real: desenvolvimento de uma interface entre tecido nervoso vivo e computador usando processamento paralelo.

1. Resumo:

Introduzido a quase duas décadas o *dynamic-clamp* têm se tornado uma das técnicas mais poderosas em eletrofisiologia celular e em estudos de redes neurais biológicas. O *dynamic-clamp* é um protocolo que combina software e hardware para produzir uma interface em tempo real entre o mundo dos modelos matemáticos e o mundo vivo, fazendo com que neurônios virtuais, simulados no computador, e neurônios vivos possam interagir uns com os outros de igual para igual (através de placas ADC/DAC que trocam informações a taxas de algumas dezenas de kHz), permitindo ao experimentador todo o poder de definir cada detalhe das equações que regem o comportamento do mundo neural virtual, assim como as conexões bidirecionais com o tecido neural vivo.

A proposta deste projeto é implementar uma nova interface flexível entre tecido nervoso vivo e computador, que será amplamente utilizada nos experimentos em nossos laboratórios em diversos experimentos. Iremos utilizar apenas software livre mantido pela comunidade (Ubuntu Linux, Comedi, RTAI ou Xenomai) e placas de aquisição de dados ADC/DAC comerciais comuns, não dedicadas à eletrofisiologia, para que o sistema possa ser facilmente duplicado por nós ou implementado em outros laboratórios. Pretendemos usar um microcomputador com pelo menos 4 processadores e, através da utilização de processamento paralelo e técnicas de tempo real, queremos atingir velocidades de atualização da ordem de 100 kHz em até 8 neurônios biológicos conectados simultaneamente a redes ou neurônios modelo.

O programa será desenvolvido em linguagem C ou C++ e iremos também desenvolver uma interface gráfica com o usuário que seja simples, flexível e capaz de fazer as tarefas mais comumente desejadas, como armazenar os dados digitalizados em disco e produzir gráficos das diferentes grandezas. A idéia é que toda a parte de simulação em tempo real, assim como a parte gráfica, sejam modulares e padronizadas, permitindo facilmente desenvolver e distribuir novos módulos que aumentem a capacidade do sistema.

Ao final do projeto o programa será intensamente testado e utilizado em experimentos em que interagimos o computador com diferentes preparações biológicas: culturas de neurônios isolados, pequenos circuitos geradores de padrões em crustáceos e sistema de localização/comunicação de peixes elétricos de campo fraco.

2. Introdução:

A atividade elétrica produzida por organismos vivos tem atraído a atenção de pesquisadores a muito tempo, como pode ser visto nos trabalhos de Luigi Galvani e Alessandro Volta com musculatura de anfíbios (entre 1770 e 1800) e os de Faraday com peixes elétricos de campo fraco (Faraday, 1839), apenas citando alguns dos mais clássicos.

Atualmente, sabemos que o funcionamento do sistema nervoso animal é todo baseado na produção e propagação de impulsos elétricos por células especializadas: os neurônios. Entretanto, entender o funcionamento de um sistema nervoso, mesmo dos mais simples, ainda constitui um gigantesco desafio, o que justifica o enorme esforço que tem sido feito pela comunidade científica nos últimas décadas em tentativas de melhorar nossa compreensão dos processos biofísicos que nos permitem perceber, agir, aprender e lembrar.

Desde o início, grandes progressos foram obtidos com a aplicação de novas maneiras de interpretar o comportamento de neurônios sob um formalismo matemático aplicado a estruturas biofísicas (Hodgkin e Huxley, 1952) e por isso este fascinante problema não interessou apenas a cientistas das áreas biomédicas. Assim, podemos considerar a neurociência como uma área de pesquisa construída de maneira naturalmente multidisciplinar, onde os avanços geralmente envolveram colaborações entre biólogos, médicos, farmacêuticos, físicos, matemáticos, engenheiros, especialistas em computação, etc.

A atividade neural é fundamentalmente complexa. Os neurônios organizam-se em redes com muitas conexões (sinapses) e laços de realimentação, e constantemente recebem, de outros neurônios, estímulos que são integrados para produzir um padrão de atividade elétrica de resposta. Assim, a atividade de uma rede neural biológica emerge das interações entre as propriedades não-lineares dos neurônios e das sinapses. Estas interações complexas permitem aos circuitos neuronais processar informação, servir de suporte a funções cognitivas e controlar o comportamento.

Entretanto, a maioria dos experimentos em eletrofisiologia nem sempre reconhece esta complexidade. Muito do nosso conhecimento sobre circuitos neurais em nível de pequenas redes é baseado em experimentos altamente reducionistas: a resposta de neurônios isolados é caracterizada usando-se estímulos extremamente simples e não realistas, como injeções de corrente contínua ou a produção de degraus de potencial.

A fixação de corrente (*current-clamp*) é implementada por um eletrodo que proporciona uma corrente fixa de valor constante à célula enquanto o potencial de membrana resultante é monitorado. Com esta técnica podemos revelar muitos dos comportamentos elétricos apresentados pelas membranas excitáveis, medir sua resistência elétrica e sua capacitância, entre outros.

Durante a fixação de voltagem (*voltage-clamp*) um circuito eletrônico mantém o potencial de membrana em determinado nível enquanto se registra

a corrente que é necessária para isso. Normalmente são introduzidos dois eletrodos no neurônio: um para medir o potencial elétrico e outro para injetar a corrente. Esta técnica é amplamente utilizada para obter diversos parâmetros necessários ao desenvolvimento de modelos matemáticos que incorporam os fenômenos biofísicos responsáveis por estes comportamentos (Hodgkin e Huxley, 1952).

Estas abordagens experimentais, embora essenciais para que pudéssemos construir nosso conhecimento sobre os blocos fundamentais usados na construção de redes neurais biológicas, nos faz questionar se não perdemos algo ao interrogar um sistema extremamente complexo com técnicas tão reducionistas e estímulos tão simples e artificiais.

Na tentativa de estudar o comportamento de neurônios e de pequenas redes em condições mais realistas, a partir de 1990 surgiu uma outra técnica denominada fixação “dinâmica” (*dynamic-clamp*) (Robinson, 1991, Robinson and Kawai, 1993, Sharp et al., 1993). Nesta técnica, um sistema computadorizado controla em tempo real a condutância da membrana em vez da corrente ou o potencial de membrana. Esta nova técnica permitiu a diversos pesquisadores começarem a estudar a interação entre células nervosas e neurônios modelo em redes neurais híbridas (Yarom, 1991; Le Masson et al., 1995). Estes experimentos conectando neurônios vivos e neurônios modelo combinam o realismo fisiológico com um completo controle sobre as propriedades dos componentes artificiais da rede. Assim, redes neurais híbridas proporcionam uma interface entre estudos experimentais e de modelagem, combinando o melhor dos dois mundos.

Desde então o *dynamic-clamp* têm se tornado uma das técnicas mais poderosas em eletrofisiologia celular e em estudos de redes neurais biológicas. Basicamente ele é constituído por um sistema de aquisição de dados, que registra a atividade de um sistema eletrofisiológico e de um software que computa em tempo real uma função arbitrária deste sinal, produzindo um sinal de resposta que é realimentado ao sistema eletrofisiológico. O funcionamento adequado do *dynamic-clamp* requer que tanto a aquisição de dados quanto a computação da corrente sejam rápidos e ininterruptos: com taxas de atualização altas o suficiente (da ordem de kHz) o sistema eletrofisiológico interage como se estivesse biologicamente conectado ao sistema simulado por software e o efeito de qualquer conjunto de canais iônicos pode ser reproduzido como se estes estivessem localizados no sítio onde a voltagem é registrada e a corrente é introduzida.

O modo como as condutâncias dos canais iônicos simulados dependem da voltagem da membrana ou do tempo é especificado por equações matemáticas que são integradas em tempo real pelo computador conectado ao neurônio biológico. De um certo modo, o *dynamic clamp* utiliza os neurônios como simuladores, permitindo investigar a importância de um tipo de condutância para a atividade elétrica de um neurônio, assim como determinar o efeito produzido pelas sinapses em uma rede, combinando o controle e flexibilidade de uma simulação no computador com a acurácia e o realismo de um experimento em eletrofisiologia.

Sob uma ampla perspectiva, as técnicas de interface entre computador e tecido neural vivo e as redes híbridas assim produzidas são parte de um contínuo de novas abordagens experimentais para o estudo do cérebro, e vão desde o estudo de pequenas redes até o desenvolvimento de interfaces cérebro-máquina entre dispositivos externos e os circuitos nervosos de animais vivos. Recentemente foi proposto que tais abordagens fossem chamadas de “neurofisiologia em tempo real” (Nicoletis, 2003) enfatizando a necessidade de operar na escala de tempo da atividade neural para interagir com o tecido nervoso. Sistemas híbridos, em todos os níveis de organização, tem o potencial de complementar métodos neurofisiológicos tradicionais e ampliar nossa compreensão dos processos neurais complexos (Prinz, 2004).

É neste contexto que apresentamos o presente Projeto de Doutorado, onde é proposto o desenvolvimento de uma nova interface flexível entre tecido nervoso vivo e computador, que será amplamente utilizada em nosso laboratório. Iremos utilizar software livre (Linux e Real-Time Linux) e placas de aquisição de dados ADC/DAC comerciais comuns para tornar a implementação do projeto acessível a outros laboratórios. Pretendemos utilizar placas de aquisição de dados com 8 entradas (National Instruments PCI-6143) e 8 saídas (National Instruments PCI-6722) analógicas simultâneas e um computador com diversos processadores (CPUs). Iremos utilizar técnicas de processamento paralelo para dividir as funções que necessitam de tempo real (aquisição de dados, cálculo dos modelos e das correntes) e as que não necessitam de tempo real (interface com o usuário) entre as várias CPUs, aumentando a velocidade de atualização das correntes.

3. Metodologia:

3.1 - O protocolo *dynamic-clamp*:

Na Figura 1 é mostrado um diagrama típico de um experimento utilizando técnicas modernas de *dynamic-clamp* para interagir modelos computacionais com neurônios biológicos ou para simular a existência de sinapses biológicas entre os neurônios vivos. Para simular a presença de condutâncias na membrana de um neurônio ou a existência de uma sinapse entre dois neurônios, é implementado um ciclo onde:

- a) Os potenciais de membrana dos neurônios vivos são medidos através de microeletrodos, amplificados adequadamente, digitalizados em um ADC e lidos pelo computador. Os modelos de neurônio ou redes e também as equações matemáticas que descrevem as condutâncias são integradas um passo obtendo-se os potenciais de membrana dos neurônios artificiais;
- b) Baseando-se nos valores medidos (calculados) dos potenciais de membrana dos neurônios vivos (artificiais) o computador integra os modelos de sinapses entre neurônios vivos e artificiais e calcula as correntes a serem injetadas nos diversos neurônios devido à composição de todas as condutâncias artificiais que estão sendo geradas;
- c) As correntes calculadas para neurônios artificiais são passadas para os modelos através de variáveis, enquanto em um DAC são produzidas tensões de saída proporcionais às correntes a serem injetadas nos neurônios vivos através de microeletrodos (após tratamento adequado nos amplificadores). Outros dispositivos também podem ser controlados em tempo real nesta parte do ciclo, de acordo com a atividade “instantânea” dos modelos ou dos neurônios biológicos.

Esse ciclo é repetido durante todo o processo e, assim, as condutâncias vão sendo alteradas dinamicamente de acordo com o valor da voltagem de membrana do próprio neurônio ou com o sinal vindo de um outro neurônio (sinapse artificial). Desse modo, o *dynamic-clamp* produz o efeito elétrico das condutâncias e sinapses artificiais como se todas elas estivessem localizadas na ponta do microeletrodo de corrente. Para que o protocolo funcione de maneira eficiente e os neurônios não percebam que a corrente injetada é atualizada em tempos discretos é necessário que este ciclo seja repetido o mais rápido possível, o que é possível graças aos modernos computadores que possuem processadores de alta velocidade e às novas placas ADC/DAC.

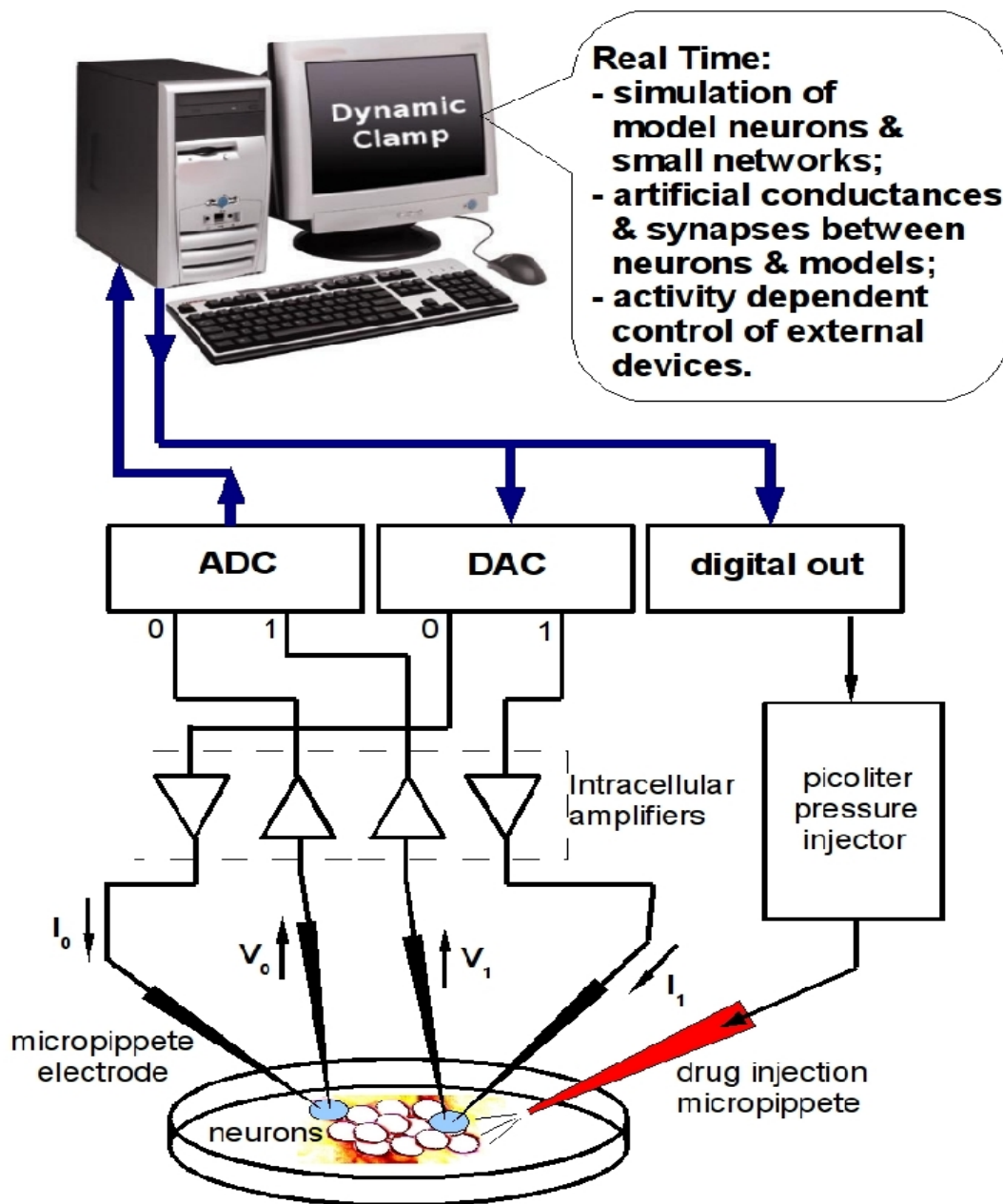


FIGURA 1 – Diagrama de um experimento típico com um protocolo moderno do tipo *dynamic-clamp*. Através de interfaces ADC e DAC conectadas a eletrodos intracelulares o computador pode medir o potencial de membrana dos neurônios vivos e injetar corrente nestes a uma alta taxa de atualização (dezenas de kHz). O comportamento dos neurônios biológicos medido em tempo real é usado para estimular os modelos de neurônios ou redes que são integrados em tempo real pelo computador. Estes por sua vez interagem com o tecido biológico através das correntes injetadas ou através de sinais químicos produzidos pela injeção de picolitros de neuromoduladores/neurotransmissores ou o controle em tempo real de outros dispositivos externos. O dynamic-clamp atua como uma interface entre o mundo dos modelos matemáticos e o mundo real, fazendo com que neurônios *in silico* e neurônios *in vivo* possam interagir uns com os outros de igual para igual, permitindo ao experimentador todo o poder de definir cada detalhe das equações que regem o comportamento do mundo neural virtual e das conexões bidirecionais com o tecido neural vivo.

3.1.1 - Limitações das implementações atuais de protocolos do tipo *dynamic-clamp*:

Dois tipos distintos de limitações existem nos protocolos de *dynamic-clamp*: aquelas de origem fisiológica e de origem tecnológica. Conforme descrevemos a seguir, as limitações tecnológicas estão sendo resolvidas com o passar do tempo e com a evolução do hardware computacional, entretanto as de origem fisiológica, inerentes ao método experimental de medir o potencial de membrana e injetar corrente nos neurônios ainda permanecem em todos as implementações.

O *dynamic-clamp* depende fortemente do poder computacional dos microcomputadores modernos e da flexibilidade dos sistemas de aquisição de dados. Desde os primeiros experimentos de Robinson (1991), Robinson and Kawai (1993) e Sharp e colaboradores (1993) o protocolo tem sido implementado em diversos sistemas: circuitos analógicos (Chance et al., 2002); diversas plataformas de software usando Windows (Pinto et al., 2001; Nadim, 2003; Nowotny et al., 2006); Real Time Linux (Butera et al., 2001; Dorval et al., 2001; Raikov et al., 2004); sistemas de aquisição de dados comerciais (Manor, 2001); até placas digitais de processamento de dados (DSP) (Le Masson, 1990; Kullmann et al., 2004). Em 2007 foi implementado um sistema capaz de simular árvores artificiais de dendritos com até 1000 condutâncias do tipo Hodgkin-Huxley (Hughes et al., 2007) e, em 2008, foi desenvolvido o primeiro sistema tipo *dynamic-clamp* que inclui modelos markovianos de condutâncias (Milescu et al., 2008).

Cada uma dessas implementações tem suas vantagens e desvantagens. Enquanto as soluções em software mais antigas ainda funcionam, do ponto de vista presente, em hardware computacional arcaico e, por isso tem que lidar com todo tipo de limitação computacional, o hardware moderno é rápido o suficiente para realizar as computações necessárias de modo fácil e rápido.

Os novos sistemas operacionais multi-tarefas, entretanto, trazem novos desafios em termos de interrupções totalmente controladas pelo sistema, que acabam produzindo oscilações no tempo de atualização da saída que se desejaria em tempo real. Em tais sistemas existem muitos processos competindo por recursos de computação e de memória, levando a atrasos e seus correspondentes artefatos na saída do *dynamic-clamp*. Algumas implementações lidam com estas flutuações no tempo de atualização considerando um tempo variável entre atualizações e corrigindo a corrente de saída (Pinto et al., 2001; Nowotny et al., 2006), tais implementações são chamadas de "*soft*" *real-time*. Sistemas em tempo real verdadeiros ("*hard*" *real-time*) permitem que seja atribuída total prioridade a um processo para evitar estes problemas, mas eles geralmente são de

instalação difícil (real-time Linux) ou muito caros (extensões real-time para Labview).

Outros inconvenientes dos softwares de *dynamic-clamp* existentes atualmente (Dorval et al. 2001, Raikov et al. 2004; Nowotny et al., 2006; Hughes et al., 2007; Milesco et al., 2008) resultam do fato de que muitos deles são desenvolvidos de modo *ad hoc* para experimentos específicos, estando desconectados dos protocolos de aquisição de dados, não apresentando uma resolução temporal adequada para implementar modelos de neurônios muito complexos, sendo difíceis de usar por um eletrofisiólogo médio e, ainda, necessitam de bibliotecas de modelos (canais iônicos, neurônios eletrônicos, sinapses e paradigmas de aprendizagem) e de flexibilidade para alterar os parâmetros em tempo real enquanto conectado ao tecido biológico. Uma boa comparação entre as diferentes implementações de *dynamic-clamp* existentes pode ser encontrada em (Prinz, Abbott e Marder, 2004 ou http://www.scholarpedia.org/article/Dynamic_clamp).

O programa de *dynamic-clamp*, que é utilizado atualmente em experimentos no Laboratório de Neurodinâmica do FFI/IFSC, onde este projeto será executado, foi desenvolvido por Pinto e colaboradores em 2001 (<http://inls.ucsd.edu/~rpinto/dynclamp.html>). Existem duas versões do programa, chamadas DYNCLAMP2 e DYNCLAMP4 (que depende de um hardware demultiplex analógico para produzir 4 saídas a partir de 2 sinais originados pela placa DAC). Ambas versões só funcionam com hardware dedicado: uma placa de aquisição de dados Axon Digidata 1200A, rodam em Windows NT e permitem conectar até 4 neurônios com qualquer combinação de sinapses químicas e elétricas desejadas (de acordo com os modelos de sinapses implementados no programa). Utilizando-se um computador tipo Pentium III com frequência de relógio de 1GHz o DYNCLAMP4 consegue realizar o ciclo de *dynamic-clamp*, conectando 4 neurônios, com uma frequência de 8 kHz, o que é suficiente para conectar neurônios de invertebrados como o siri azul brasileiro *Callinectes sapidus*. Entretanto, se quisermos utilizar este protocolo para conectar neurônios de mamíferos ou outros vertebrados (em que os potenciais de ação tem uma largura menor que 1 ms) precisamos de uma frequência de pelo menos 30 kHz. Outra limitação do programa atual é o número máximo de neurônios que podem ser conectados ($N_{\text{máx}} = 4$). Com a utilização de neurônios eletrônicos e a construção de redes neurais híbridas, há a necessidade de se conectar mais de quatro neurônios, o que não só não é possível com o hardware atual, mas também tornaria o ciclo ainda mais lento no programa atual.

Neste projeto pretendemos resolver diversos desses problemas com um novo software de *dynamic-clamp* avançado que incorpore os protocolos com as características mencionadas e que seja capaz de controlar também

dispositivos como micro-injetores de neuromoduladores em função de eventos que ocorrem em tempo real na preparação.

A principal limitação de origem fisiológica de todos os programas de dynamic clamp é a mesma que apresentam os métodos de *voltage* e *current-clamp*: o problema de medir e fazer o *clamping* do potencial de membrana em situações em que o neurônio não é eletrotonicamente compacto. Como o *dynamic clamp* simula uma fonte puntual de condutâncias (ponta do microeletrodo) ele não descreve acuradamente a distribuição normal de canais iônicos na membrana da célula. Em um neurônio extenso, este fato pode limitar o uso do *dynamic-clamp* especialmente com relação à correntes rápidas.

3.2 – Hardware, Real-Time Linux e drivers para aquisição de dados:

Pretendemos desenvolver nosso protocolo avançado de dynamic-clamp em uma plataforma Linux instalada em um microcomputador com multiprocessadores (no mínimo 4 processadores), a ser adquirido com recursos da FAPESP que já possuímos. Iremos inicialmente utilizar a distribuição Linux chamada Ubuntu versão 8.04 LTS – Desktop (www.ubuntu.com). Trata-se de software livre, desenvolvido e mantido pela comunidade. A versão 8.04 LTS foi escolhida pois embora tenha sido lançada em abril/2008 será mantida até abril de 2011 (com atualizações de segurança e correção de erros nos programas), por mais tempo que a versão mais nova Ubuntu 8.10.

A distribuição Ubuntu 8.04 LTS tem suporte para multiprocessadores, chamado SMP (*Symmetric MultiProcessing*). Entretanto o kernel padrão que é instalado não vem com o SMP habilitado e utiliza apenas a primeira CPU que encontrar. Para permitir utilizar o SMP iremos recompilar o kernel substituindo o kernel original pelo kernel recompilado com o SMP habilitado.

A leitura dos dados dos potenciais de membrana dos neurônios biológicos será feita pelo computador através de uma placa ADC National Instruments modelo PCI-6143, que já possuímos, com 8 entradas analógicas amostradas a uma resolução de 16-bits e até 250 k amostras/s por canal. Os sinais de saída analógica, que correspondem às correntes a ser injetadas nos neurônios ou controle de dispositivos como micro-injetores de drogas, serão produzidos por uma placa DAC National Instruments modelo PCI-6722, que também já possuímos, com 8 saídas analógicas com resolução de 13 bits e velocidade máxima de 182 k amostras/s por canal. Assim, o limite de nossa frequência máxima do ciclo de dynamic-clamp devido ao hardware de aquisição de dados seria da ordem de 180 kHz, o que equivale a ter um tempo T entre atualizações de corrente da ordem de 5,6 μ s. Na prática se conseguirmos que os modelos rodem com o dynamic-clamp a uma frequência de 100 kHz ($T = 10 \mu$ s), já seria mais do que suficiente, inclusive

para simular condutâncias rápidas de sódio em membranas de neurônios de mamíferos.

Iremos também instalar os drivers desenvolvidos no projeto Comedi: (*Linux Control and Measurement Device Interface*) - <http://www.comedi.org> - para acessar as placas de aquisição de dados que adquirimos e que são compatíveis com estes drivers open-source mantidos pela comunidade de software livre.

Para implementar tarefas em tempo real no kernel do Linux iremos testar os softwares RTAI (Real Time Application Interface - <https://www.rtai.org>) e o Xenomai (Xenomai: Real-Time Framework for Linux - <http://www.xenomai.org>) quanto a facilidade de instalação e funcionalidade com os drivers Comedi. Ambos são extensões para o kernel do Linux que permitem implementar tarefas “hard” real time em que o tempo de execução tem que ser determinístico. Estas operações são implementadas através do controle de interrupções entre o hardware e o sistema operacional. As interrupções necessárias para o processamento determinístico são processadas pelo core de tempo real, enquanto outras interrupções são enviadas ao sistema operacional não real-time. O sistema operacional (Linux) é executado como uma tarefa de mais baixa prioridade. Pilhas do tipo primeiro a entrar, primeiro a sair (FIFOs) ou a memória compartilhada podem ser usados para compartilhar os dados entre o sistema operacional e o core de tempo real. Há outros softwares para implementar o tempo real como o RT-Linux (<http://www.rtlinux-gpl.org>), que teve seus direitos comprados pela companhia Wind River Systems e não é mais atualizado a algum tempo, por isso optamos pelos dois que são mantidos pela comunidade de software livre.

3.3 – Processamento Paralelo:

Dada a disponibilidade de microcomputadores de dois, quatro ou mesmo oito núcleos de processamento no mercado, uma maneira eficiente de controlar os experimentos é a utilização diferenciada dos núcleos para a execução das tarefas necessárias. O Xenomai acima citado, permite a utilização diferenciada dos núcleos, assegurando que cada um dos núcleos execute tarefas específicas previamente definidas. A aquisição de dados e controle do experimento podem ser feitas através do kernel de tempo real, que priorizará de maneira determinística a execução destes processos alocando um ou dois núcleos para este fim. Na área de usuário, o sistema permite ainda uma priorização de recursos intermediária, que poderá ser usada para possibilitar a análise em tempo real dos dados adquiridos, através da alocação de outros núcleos. A visualização poderá ser feita usando os recursos restantes do espaço de usuário, visto que o tempo de resposta necessário para este tipo de função não é crítico. Para a parte de tratamento de dados em tempo real, a programação em threads provavelmente será a melhor solução por permitir um melhor balanceamento de carga e a priorização das mesmas.

3.4 – Preparações Biológicas:

Nosso plano é que ao final do Doutorado teremos o novo software e hardware integrados como ferramenta para o estudo de redes neurais biológicas em nossos laboratórios (Lab. de Neurodinâmica e Dipteralab). Trabalhamos com várias preparações biológicas diferentes que poderemos usar para testar nosso novo *dynamic-clamp*: estas preparações representam diferentes níveis de organização e vão desde o nível celular até sistemas sensoriais de um animal intacto conforme descrevemos abaixo. Assim, nossa proposta não se trata apenas de um projeto isolado, já que a execução deste projeto de doutorado está relacionada a outros projetos que temos em andamento em nossos laboratórios e que serão muito beneficiados pela nova ferramenta. Em todas as preparações listadas abaixo, os experimentos que realizamos consistem em interagir os neurônios vivos com modelos computacionais e por isso o *dynamic-clamp* é uma ferramenta de importância absolutamente fundamental.

Durante todos os procedimentos que envolvem animais em nossos laboratórios seguimos os princípios éticos aconselhados pela Society for Neuroscience (www.sfn.org).

3.4.1 – Neurônios em cultura:

Culturas de neurônios isolados permitem estudar de maneira controlada como uma informação simples (na forma de um padrão de disparos) é processada e/ou transmitida de um neurônio para outro e entre estes e um computador. Também podemos estudar como uma determinada informação pode alterar a configuração sináptica de um circuito, formando memórias ou produzindo novos padrões (Marder, 1998). Este tipo de preparação é a mais invasiva e por isso é a que permite a maior flexibilidade ao experimentador que tem controle quase total sobre o experimento. No momento estamos implementando culturas de dois tipos de neurônios: do molusco *Aplysia brasiliana* e do gânglio estomatogástrico de crustáceos *Callinectes sapidus*. Maiores detalhes sobre estas culturas podem ser encontrados em (Dagan e Levitan, 1981; Kleinfeld, Raccaia-Behling, e Chiel, 1990; Panchin et al., 1993).

3.4.2 – Centros Geradores de Padrões (CPGs) de crustáceos:

A preparação biológica permite trabalharmos com pequenos circuitos nervosos intactos e é bastante invasiva, pois consiste em dissecar o sistema nervoso estomatogástrico (STG) que controla os músculos do estômago de siris *Callinectes sapidus* anestesiados por 40 minutos de imersão em gelo picado fundente. Maiores detalhes sobre o procedimento completo de dissecação, que pode levar até 5 horas (dependendo da aptidão do experimentador e do grau de gordura encontrado nos tecidos), podem ser encontrados em diversas referências, por exemplo (Mulloney e Selverston,

1974; Selverston e Moulins, 1987). Após ser retirada do animal e mantida em solução fisiológica, parte do sistema nervoso estomatogástrico (o CPG Pilórico) apresenta, por até 10 horas, os mesmos padrões de disparo de potenciais de ação em trens (bursts) periódicos que apresentava in vivo para produzir os movimentos de filtração e bombeamento de alimento do estômago para o intestino do animal (Marder e Selverston, 1992). O CPG Pilórico é estudado desde a década de 70 e é formado por 14 neurônios que são identificáveis de animal para animal, as sinapses entre os neurônios são bem conhecidas, mas ainda não se pode afirmar de nenhum modo rigoroso como os padrões periódicos são produzidos por este sistema complexo. Os neurônios apresentam comportamento intrínseco irregular (caótico) e o padrão é uma propriedade emergente do circuito (Selverston et al., 2000).

3.4.3 – Sistema de eletrolocalização e eletro-comunicação de peixes elétricos de campo fraco:

É a preparação biológica menos invasiva com que trabalhamos, pois consiste em estudar um animal vertebrado vivo e intacto, analisando sinais elétricos emitidos por seu sistema sensorial durante a execução de suas atividades normais. O fato de algumas espécies de peixes utilizarem um órgão elétrico especializado para produzir um campo elétrico pulsado ao redor de seu corpo (Caputi, 1999) já é conhecido a muito tempo (Faraday, 1839). Objetos que estejam dentro deste campo alteram a corrente induzida em órgãos eletroreceptores que se distribuem por toda a epiderme do peixe (Castelló et al, 2000). 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 de 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. O modo como o sistema nervoso desses peixes é capaz de realizar todas essas funções é ainda desconhecido e objeto de diversas pesquisas na área de sistemas sensoriais (Bullock, 1999). Assim, através de medidas simples dos pulsos elétricos que estes peixes produzem externamente, temos acesso de modo não invasivo a um sinal complexo produzido pelo sistema nervoso do peixe e que pode ser usado para interagir um computador com este sistema nervoso.

3.5 – Eletrofisiologia:

Nos experimentos com culturas ou com células do STG a temperatura da preparação é mantida constante em 23°C usando uma micro-perfusão constante de solução fisiológica oxigenada (em cada caso observar as referências citadas na preparação para a composição das soluções fisiológicas) que passa através de uma serpentina conectada a um dispositivo termoeletrônico tipo Peltier ligado a um controle de temperatura PID. As medidas intracelulares do potencial de membrana dos neurônios e injeção de corrente são obtidas com micro-eletrodos de vidro preenchidos com solução 3 M K-acetato + 0.1 M KCl com resistência entre 10 e 20 MΩ. Os eletrodos intracelulares são ligados a amplificadores (x10) Neuroprobe 1600 bridge-amplifiers (A-M Systems, Carlsborg, WA) ou Axoclamp-2B (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Em experimentos com o STG, medidas extracelulares são obtidas usando pares de eletrodos de fio de aço-inox em que um dos fios toca o nervo e é isolado com vaselina da solução fisiológica. Estes eletrodos são amplificados diferencialmente (x 10000) usando amplificadores A-M 1700 differential AC amplifier (A-M Systems, Carlsborg, WA). Normalmente um computador é usado para fazer o *dynamic-clamp* e outro computador é usado para armazenar os sinais elétricos em disco para análise futura: microcomputador Pentium IV com sistema Windows 2000 e placa de aquisição ADC Axon Digitada 1322 + software Axoscope 9 (ambos da Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Nos experimentos com peixes elétricos, oito eletrodos são colocados nos vértices de um aquário cúbico de 40cm de lado cheio com água filtrada e oxigenada. Um dos eletrodos é usado como referência e o sinal captado pelos outros sete eletrodos é amplificado diferencialmente com relação à referência por circuito eletrônico desenvolvido em nosso laboratório (ganho 200x baseado em amp.op. LM308). A saída dos amplificadores é ligada diretamente ao ADC de aquisição de dados – placa National PCI-MIO 16E1 (National Instruments, Austin, TX) controlada por software de aquisição de dados DasyLab (National Instruments Ireland Resources Limited & meas x GmbH & Co, Moenchengladbach, Germany). Assim podemos medir os pulsos do peixe sem a necessidade de restringir seus movimentos e também inferir sua posição e movimentação pela diferença de amplitude do sinal nos diferentes eletrodos.

4. Proposta de Trabalho:

Durante a execução deste projeto a estudante irá desenvolver um programa em linguagem C ou C++ que irá implementar um protocolo de *dynamic-clamp* em uma plataforma RT-Linux com processamento paralelo. Para isso inicialmente será instalado em um computador com 4 ou 8 processadores (que iremos adquirir em breve com recursos da FAPESP) o sistema operacional Linux da distribuição Ubuntu 8.04. A estudante irá recompilar o kernel para habilitar o uso de multiprocessadores (SMP), instalar as placas ADC e DAC, obter e instalar os drivers Comedi das placas ADC/DAC, obter e instalar as extensões de tempo real Xenomai e RTAI.

Após esta fase inicial iremos testar qual das extensões de tempo real funcionam melhor com as placas de aquisição de dados e resto do hardware. Escolhido o pacote de real-time e testado todo o hardware do sistema, a estudante irá iniciar a implementação do protocolo de *dynamic-clamp* em linguagem C ou C++ usando processamento paralelo de modo a dedicar uma CPU exclusivamente às tarefas de aquisição de dados em tempo real nas placas ADC e DAC. Enquanto isso, o resto das CPUs será dedicado ao cálculo em tempo real das correntes e modelos de neurônios artificiais ou redes. Acreditamos que com o processamento paralelo seremos capazes de atualizar o ciclo de *dynamic-clamp* a uma taxa superior a 100 kHz (no caso de simular modelos artificiais simples), o que se aproxima da taxa de amostragem da placa DAC que nos limita a 180 kHz/canal, enquanto a placa ADC é capaz de adquirir a até 250 kHz/canal.

Uma interface gráfica com o usuário também será desenvolvida, mas irá rodar com uma prioridade muito menor e fora do sistema em tempo real. Pretendemos que esta interface seja capaz de armazenar os dados digitalizados em disco e produzir gráficos das diferentes grandezas. Além disso, esta interface irá controlar o início e fim das tarefas em tempo real, assim como permitir ao usuário alterar facilmente os parâmetros de uma simulação. A idéia é desenvolver uma interface simples e flexível que seja possível de usar em diferentes experimentos. Queremos deixar prontas, na forma de módulos, as tarefas mais comuns que se poderia desejar, como geradores de estímulo de vários tipos, alguns modelos de neurônios, sinapses químicas, elétricas e condutâncias tipo H-H, determinísticas ou markovianas.

Assim que cada parte do programa estiver funcionando, iremos utilizar neurônios eletrônicos que simulam o comportamento elétrico de células vivas (Pinto et al., 2000) para testar o desempenho do software e corrigir qualquer eventual problema que poderia danificar as células vivas. Assim que estiver tudo testado e corrigido a estudante irá aprender algumas das técnicas de preparação que utilizamos no laboratório e irá utilizar o novo programa para interagir nossas preparações biológicas com o computador.

Finalmente, queremos produzir um CD/DVD que facilite a instalação de todo o sistema (se possível queremos produzir um programa que faça a instalação de forma automática) e toda a documentação necessária para que o sistema possa ser facilmente duplicado em nosso grupo ou utilizado por outros grupos de pesquisa. Para isso, pretendemos desenvolver todos os módulos do programa em um padrão que permita o desenvolvimento e distribuição de novos módulos (de tempo real ou gráficos) que sejam simplesmente acoplados ao programa original, ampliando suas capacidades.

5. Cronograma:

1º ano:

- cursar disciplinas para completar os créditos exigidos para o doutorado;
- Início da implementação do protocolo de *Dynamic Clamp* em *Real-Time Linux* com processamento paralelo ;

2º ano:

- cursar disciplinas para completar os créditos exigidos para o doutorado;
- Concluir a implementação do protocolo de *Dynamic Clamp* em *Real-Time Linux*;
- Aquisição de dados utilizando o *Dynamic Clamp* em neurônios biológicos, artificiais e redes neurais híbridas;
- Início da Redação da Tese;
- Redação de eventuais trabalhos que tenham sido gerados durante a execução do projeto;

3º ano:

- cursar alguma eventual disciplina necessária para concluir os créditos exigidos para o doutorado;
- Concluir a Redação da Tese;
- Redação de trabalhos gerados durante a execução do projeto;
- Produção de um CD ou DVD com todos os programas usados para instalar o sistema e com os programas de nossa versão do *dynamic-clamp* com instruções para instalação (ou instalação automática) em outros computadores e para distribuição a outros laboratórios colaboradores;
- Defesa da Tese.

6. Referências:

- Bullock, T.H. (1999): The future of research on electroreception and electrocommunication, *J. Exp. Biol.* **202**: 1455-1458.
- Butera Jr., R.J., Wilson, C.G., Delnegro, C.A., Smith J.C. (2001): A methodology for achieving high-speed rates for artificial conductance injection in electrically excitable biological cells, *IEEE Trans Biomed Eng* **48**: 1460-70.
- Caputi, A. (1999): The electric organ discharge of pulse gymnotiforms: the transformation of a simple impulse into a complex spatiotemporal electromotor pattern, *J. Exp. Biol.* **202**: 1229-1241.
- Caputi, A. and Budelli, R.(1995): The electric image in weakly electric fish: I. A databased model of waveform generation in *Gymnotus carapo*, *J. Comput. Neurosci.* **2**: 131-147.
- Castelló, M.E., Aguilera, P.A., Trujillo-Cenóz, O. and Caputi, A.A. (2000): Electroreception in *Gymnotus carapo*: prereceptor processing and the distribution of electroreceptor types, *J. Exp.Biol.* **203**: 3279-3287.
- Chance, F.S., Abbott, L.F., Reyes, A.D. (2002): Gain modulation from background synaptic input, *Neuron* **35**: 773–82.
- Dagan, D. and Levitan, I. B. (1981): Isolated identified *Aplysia* neurons in cell culture, *J. Neurosci.* **1**: 736-740.
- Dorval, A. D., Christini, D. J., and White, J. A. (2001): Real-Time Linux Dynamic Clamp: A Fast and Flexible Way to Construct Virtual Ion Channels in Living Cells, *Ann. Biom. Engineering* **29**, 897-907.
- 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.
- Hodgkin, A. L. e Huxley, A. F. (1952): A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve, *J. Physiol.* **117**, 500-544.
- Hughes, S.W., Lorincz, M., Cope, D.W., and Crunelli (2007): NeuReal - An interactive simulation system for implementing artificial dendrites and large hybrid networks, *J. Neurosci. Methods* **169**: 290-301.
- Kleinfeld, D., Raccaia-Behling, F., and Chiel, H.J. (1990): Circuits constructed from identified *Aplysia* neurons exhibit multiple patterns of persistent activity, *Biophys. J.* **57**:697-715.
- Kullmann, P.H., Wheeler, D.W., Beacom, J., Horn, J.P. (2004): Implementation of a fast16-bit dynamic clamp using LabVIEW-RT, *J Neurophysiol* **91**: 542–54.
- Manor, Y. (2001): Dynamic Clamp on LabWindows/CVI, <http://www.bgu.ac.il/~yairman/cvi.html>.
- Marder, E. (1998): From biophysics to models of network function, *Annu. Rev. Neurosci.* **21**: 25-45.

- Marder, E. and Selverston, A.I. (1992): Modeling the stomatogastric nervous system, in *Dynamic Biological Networks: The Stomatogastric Nervous System*, eds. Harris-Warrick, R.M. et al.
- LeMasson, G. (1990): MAXIM—simulation software and dynamic clamp. <http://www.ixl.fr/contenu/statique/gpe/conception/integration/neurones/english/maxim.html>.
- LeMasson, G., LeMasson, S., and Moulins, M. (1995): From conductances to neural network properties: Analysis of simple circuits using the hybrid network method, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **64**: 201-220.
- Milescu, L.S., Yamanishi, T., Ptak, K., Mogri, M.Z., Smith, J.C. (2008): Real-time kinetic modeling of voltage-gated ion channels using dynamic clamp. *Biophys J* **95**: 66-87.
- Mulloney, B. and Selverston, A.I. (1974): Organization of the stomatogastric ganglion of the spiny lobster, *J. Comp. Physiol.* **91**: 1-32.
- Nadim, F. (2003): Windows Dynamic Clamp, <http://cancer.rutgers.edu/software/>.
- Nicolelis, M.A.L. (2003): Brain-machine interfaces to restore motor function and probe neural circuits, *Nat. Rev. Neurosci.* **4**: 417-422.
- Nowotny, T., Szücs, A., Pinto, R.D., Selverston, A.I. (2006): StdpC: A modern dynamic clamp, *J. Neurosci. Methods* **158**: 287–299.
- Panchin, Y. V., Arshavsky, Y. I., Selverston, A. I., Cleland, T. A. (1993), Lobster stomatogastric neurons in primary culture. 1. Basic characteristics, *J. Neurophysiol.* **69**, 1976-1992.
- Pinto, R.D., Varona, P., Volkovskii, A. R., Szücs, A., Abarbanel, H.D.I. e Rabinovich, M. I. (2000): Synchronous behavior of two coupled electronic neurons, *Phys. Rev. E* **62**, 2644-2656.
- Pinto, R. D., Elson, R. C., Szücs, A., Rabinovich, M. I., Selverston, A. I. e Abarbanel, H. D. I (2001): Extended dynamic clamp: controlling up to four neurons using a single desktop computer and interface, *J. Neurosci. Methods.* **108**, 39-48
- Prinz, A. A. (2004): Neural networks: models and neurons show hybrid vigor in real time, *Current Biology* **14**, R661-R662
- Prinz, A.A., Abbott, L.F., Marder, E. (2004): The dynamic clamp comes of age, *Trends Neurosci* **27**: 218–24.
- Raikov, I., Preyer, A., Butera, R.J. (2004): MRCI: a flexible real-time dynamic clamp system for electrophysiology experiments, *J Neurosci Methods* **132**:109–23.
- Robinson, H.P.C. (1991): Kinetics of synaptic conductances in mammalian central neurons, *Neurosci. Res.* **16**: VI.
- Robinson, H.P.C., Kawai, N. (1993): Injection of digitally synthesized synaptic conductance transients to measure the integrative properties of neurons, *J. Neurosci. Methods* **49**: 157-165.
- Selverston, A.I. and Moulins, M. (1987): *The Crustacean Stomatogastric Ganglion: A Model for the Study of Central Nervous Systems*, Springer-Verlag, New York.

Selverston, A. I., Rabinovich, M. I., Abarbanel, H. D. I., Elson, R., Szucs, A., Pinto, R. D., Huerta, R., e Varona, P. (2000): Reliable circuits form irregular neurons: a dynamical approach to understanding central pattern generators, *J. Physiol. (Paris)* **94**, 357-74

Sharp, A. A., O'Neil, M. B., Abbot, L. F. e Marder, E. (1993): Dynamic clamp: computer-generated conductances in real neurons, *J. Neurophysiol.* **69**: 992-995.

Yarom, Y. (1991): Rhythmogenesis in a hybrid system — interconnecting an olivary neuron to an analog network of coupled oscillators, *Neuroscience* **44**: 263-275.

São Paulo, 27 de março de 2009

Gisele Strieder Philippsen

Reynaldo Daniel Pinto
orientador

Guilherme Matos Sipahi
co-orientador