

Universidade de São Paulo - USP
Instituto de Física de São Carlos
Departamento de Física e Informática
Laboratório de Neurodinâmica/Neurobiofísica

Carolina Menezes Silvério

**Integração da atividade dos músculos controladores de direção e da
informação visual sensorial: uma abordagem sistêmica do voo em
Chrysomya megacephala.**

Projeto de Mestrado apresentado à CPG-IFSC

Orientador: Reynaldo Daniel Pinto

São Carlos
2010

Resumo

Neste projeto de pesquisa propomos a adaptação de um aparato experimental para permitir medir simultaneamente a atividade dos músculos que controlam o voo e dos neurônios H1, sensíveis a movimentos na direção horizontal, em moscas *Chrysomya megacephala*. Será desenvolvido um suporte especial onde a mosca permanecerá fixada mas poderá bater as asas sem movimentar as regiões onde os eletrodos de medida são introduzidos. Uma imagem realista (paisagem natural projetada em uma tela) que se move horizontalmente de maneira controlada será apresentada e a mosca será estimulada para que tente voar nessas condições. Pretendemos verificar se podemos usar o padrão muscular para controlar a imagem em tempo real, o que permitirá estudarmos se a resposta dos H1 é puramente sensorial ou se ela é influenciada pela direção de voo escolhida pelo animal. A análise de dados será feita utilizando-se ferramentas da Teoria da Informação, além de métodos tradicionais de análise de dados em física. O projeto será executado junto ao Laboratório de Neurodinâmica e ao Dipteralab do DFI-IFSC onde encontra-se o aparato de produção de estímulos visuais e medida dos neurônios H1.

1. Introdução e Justificativa

O sistema visual das moscas tem sido bastante utilizado como modelo para estudo do processamento de informação sensorial no sistema nervoso (Farrow et al., 2003). Em vários trabalhos o comportamento de disparos de potenciais de ação do neurônio H1, que é sensível a movimentos da imagem na direção horizontal, é registrado durante experimentos onde é apresentado um padrão de imagem que se desloca horizontalmente de maneira pré-determinada, e calcula-se a informação que passa do estímulo visual para o padrão neural (Borst & Haag, 2002).

Tradicionalmente, os experimentos consistem em fixar a mosca em um suporte e, através de um microeletrodo inserido cuidadosamente na placa lobular, exposta através de microcirurgia, gravar a atividade extracelular do neurônio H1, enquanto o animal observa um padrão de barras verticais que se move horizontalmente (Frye & Dickinson, 2001).

Claramente estas condições estão muito longe de ser parecidas com as que o animal enfrenta na realidade, onde necessita usar um grande fluxo de informação visual em um curto intervalo de tempo para estimar o que está ocorrendo ao seu redor durante o voo e controlar seus movimentos adequadamente (Dickinson , 2005) . A informação sensorial combinada com mecanismos eficientes de voo, como os músculos de direção que ajustam finamente a performance das asas, é que permite às moscas realizar manobras em alta velocidade e garantiu seu sucesso durante o processo de evolução

Como nos experimentos tradicionais o estímulo visual é bastante pobre - na maioria das vezes por dificuldades tecnológicas em gerar imagens com as

características necessárias para o animal entender o estímulo como sendo um movimento real e não uma sucessão de imagens (Gazzino , 2009) - e a mosca não tem qualquer poder de interferir no estímulo, como ocorreria se ela quisesse mudar a direção do vôo, não se pode afirmar com certeza se o comportamento de disparos do H1 é puramente sensorial ou não. Sabe-se que em animais superiores, mesmo a atividade da região do córtex mais próxima do estímulo visual (V1), que acreditava-se ser um simples mapeamento retinotópico físico, é altamente influenciada pelo estado de atenção e consciência do indivíduo (Müsseler et al., 2005; Wallis & Arnold, 2009).

Neste contexto, este projeto de mestrado pretende ser uma primeira fase em que aperfeiçoaremos os experimentos para permitir medir simultaneamente a atividade dos músculos de direção e dos neurônios H1 sem que a mosca tenha ainda qualquer controle sobre o movimento da imagem apresentada. Assim, a estudante irá aprender e desenvolver técnicas bem estabelecidas de preparação, aquisição e análise de dados em neurofisiologia para estudar um problema ainda em aberto, através de um experimento inédito. Em uma segunda fase, que provavelmente irá se desdobrar em um projeto de doutorado, a própria mosca irá controlar o movimento da imagem em tempo real (Pinto et al., 2001) ao tentar mudar a direção de seu vôo.

2. Objetivos

O objetivo deste projeto é permitir à estudante um treinamento em técnicas de eletrofisiologia tradicionais de preparação, aquisição de dados e análise utilizando ferramentas da Teoria da Informação direcionadas a responder uma interessante questão em aberto no sistema visual da mosca, tradicionalmente utilizado como paradigma de processamento de informação visual por um sistema nervoso. Iremos estudar a relação entre o estímulo visual apresentado e o comando enviado aos músculos de direção que controlam o voo do animal. O aparato e as técnicas desenvolvidas durante a execução deste projeto irão permitir realizar experimentos onde a atividade dos músculos de direção será observada por um computador que, em tempo real, irá produzir um deslocamento da imagem na direção em que a mosca teria seguido, produzindo assim um ambiente de voo virtual onde poderemos verificar se a resposta dos neurônios H1 é puramente sensorial ou se depende do controle do voo ser executado pelo animal.

3. Proposta de trabalho

Inicialmente a estudante irá aprender as técnicas de dissecação, preparação e aquisição de dados do sistema nervoso de *Chrysomya megacephala* para medidas extracelulares dos neurônios H1, já dominadas pelo pessoal do Dipteralab. Em seguida irá trabalhar no desenvolvimento de um suporte que permita medir simultaneamente a atividade do H1 e dos músculos de direção. Além disso, irá procurar maneiras de estimular a mosca (através de odores, fluxo de ar, etc...) para que esta tente voar mesmo estando presa ao suporte. Provavelmente será necessário manter as asas soltas do suporte, o que trará problemas de vibração quando a mosca tentar voar, que terão que ser resolvidos com a adaptação do manipulador do eletrodo de medida do H1.

Assim que o suporte estiver funcionando de maneira adequada e tenhamos encontrado técnicas adequadas de estimular a mosca a voar, iremos iniciar as medidas dos músculos de direção. Para isso, adaptaremos um par de eletrodos de tungstênio a dois micromanipuladores que ficaram dos lados do suporte da mosca e irão posicionar e manter os eletrodos na posição correta durante o experimento.

A estudante também irá, durante todo o desenvolvimento do projeto, produzir seqüências artificiais de movimentos da imagem que serão utilizadas como estímulos visuais gerados por computador e adaptar programas desenvolvidos no Dipteralab para analisar, usando técnicas da Teoria da Informação, os sinais de: estímulo, atividade do H1, atividade dos músculos de direção.

4. Cronograma de execução

O cronograma proposto para este projeto de mestrado é:

Primeiro Ano de Vigência da Bolsa:

- Cursar disciplinas para obter os créditos necessários para o programa de mestrado do IFSC;
- Aprender as técnicas de dissecação e preparação de sistema nervoso de *Chrysomya megacephala* para medidas extracelulares dos neurônios H1 sensíveis a movimentos na direção horizontal;
- Realizar experimentos registrando a atividade do neurônio H1 quando o animal é submetido a estímulos visuais realistas gerados por computador;
- Início da adaptação do aparato experimental para permitir a medida da atividade dos músculos controladores da direção do voo e a atividade do neurônio H1 simultaneamente;
- Implementação de programas, início da aquisição e análise dos dados;

Segundo Ano de Vigência da Bolsa:

- Cursar eventuais disciplinas que ainda sejam necessárias para a obtenção dos créditos exigidos pelo programa;
- Concluir a adaptação do aparato experimental;
- Aquisição de dados;
- Conclusão do trabalho de análise dos dados;
- Redação de eventuais trabalhos decorrentes da execução do projeto;
- Participação em eventos com o intuito de divulgar os resultados obtidos na pesquisa.
- Redação e apresentação da dissertação de mestrado.

5. Materiais e métodos

I. Sistema visual da mosca

O sistema visual da mosca é dividido em cinco estruturas principais : “Olho Composto”, “Lâmina”, “Medula”, “Lóbula” e “Placa Lobular” (Figura 1) . O processamento da informação visual começa no olho composto, na mosca essa estrutura é composta por aproximadamente 5000 unidades chamadas de omatídeos (Franceschini, 1982). Cada omatídeo possui uma lente de aproximadamente 30 micrômetros de diâmetro, e oito células fotorreceptoras sensíveis a comprimentos de onda na região do ultravioleta , azul e verde. Seis fotorreceptores de omatídeos vizinhos tem eixos ópticos paralelos e os sinais que emitem são combinados no próximo nível, a lâmina. Já os outros dois fotorreceptores não possuem conexão com a lâmina e seus sinais vão direto para a medula. Tanto a medula quanto a lóbula possuem funções no sistema visual ainda pouco estudadas (Mesquita, 2010) .

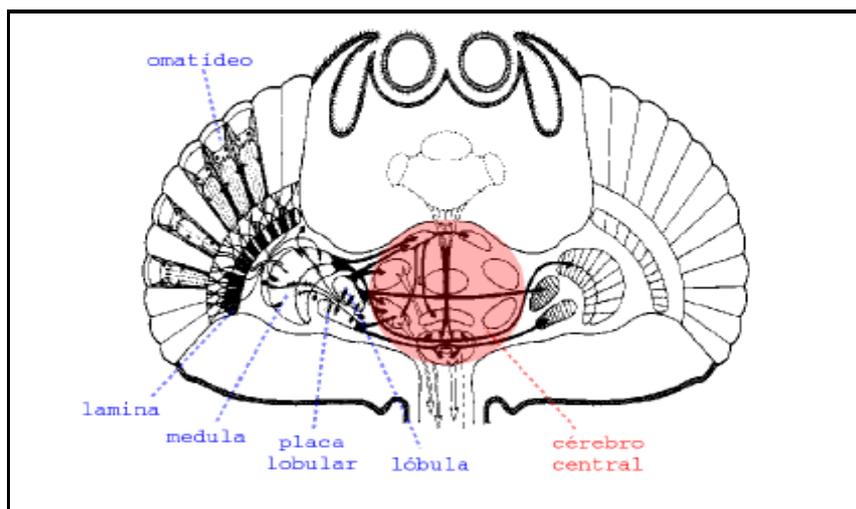


Figura 1 – Sistema visual da mosca. Corte horizontal da cabeça da mosca indicando os vários estágios do processamento visual: Omatídeo, Lâmina, Medula, Placa Lobular e Lóbula. (Figura adaptada de Kirschfeld, 1979)

Nosso interesse está na placa lobular (Figura 2) , que contem cerca de 60 neurônios gigantes (diâmetro do corpo celular de aproximadamente 10 μm) que estão relacionados com a detecção do movimento. Entre os neurônios presentes na placa lobular está o H1, que é sensível a movimentos horizontais e está presente nos dois hemisférios da cabeça da mosca.

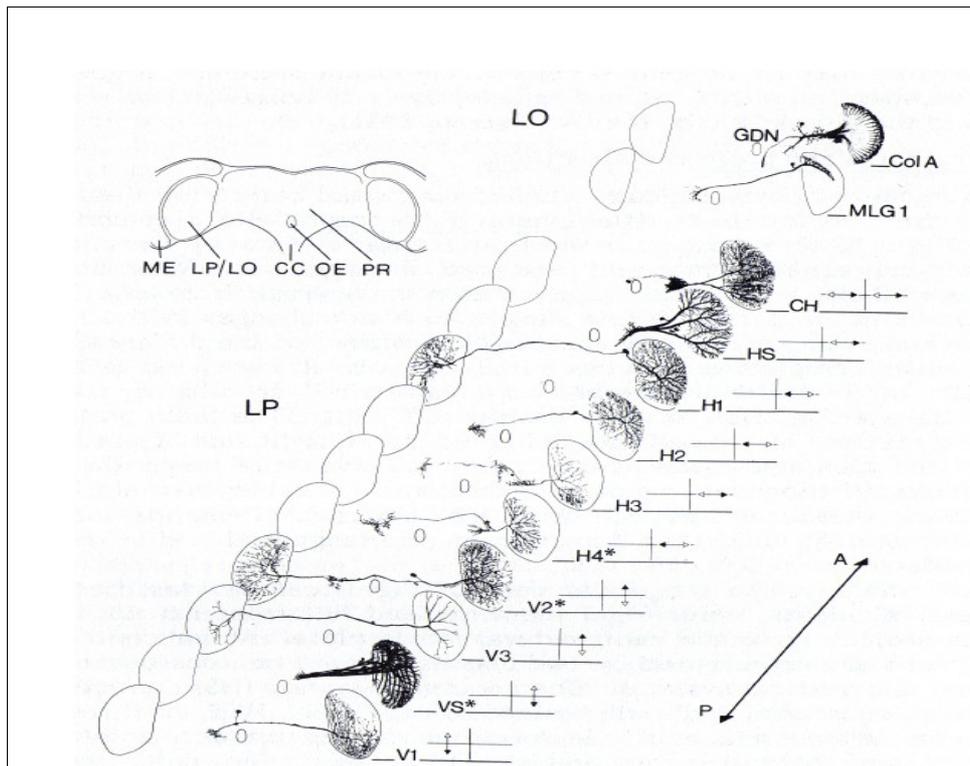


Figura 2 – Organização dos neurônios na placa lobular nos lados esquerdo e direito do lóbulo óptico. As células estão apresentadas conforme as camadas de arborização mais posteriores (P) e anteriores (A) do lóbulo direito. As setas indicam a direção preferencial de cada neurônio (seta cheia) e direção de inibição (seta vazia). Asteriscos indicam células com direções preferenciais complexas. (ME: medula, LP: Placa Lobular, LO: lóbulo, CC: conexão cervical, OE: esôfago, PR: protocerebelo). (Castro, 2008)

A resposta elétrica do neurônio H1 se dá na forma de sequencias de pulsos elétricos , ou potenciais de ação (spikes) (Figura 3) .

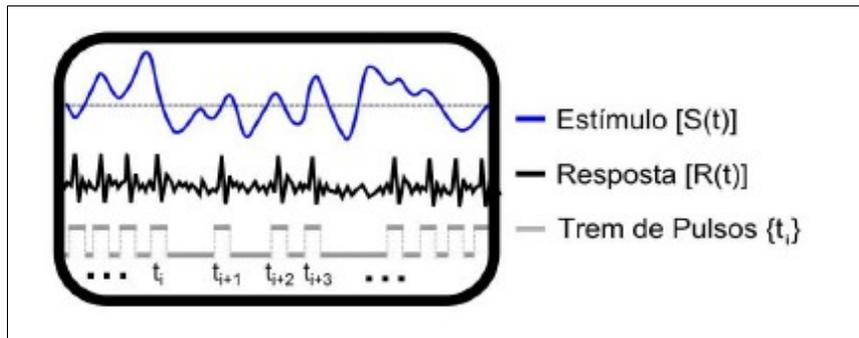


Figura 3 – Apresentamos um estímulo que varia no tempo para a mosca e obtemos a resposta em sequencias quase idênticas de spikes do neurônio H1, e obtemos o tempo de cada pulso (trem de pulsos) (Mesquita , 2010) .

II. Os músculos de direção

A musculatura responsável pelo vôo consiste de dois grupos de músculos especializados que diferem tanto anatomicamente quanto no modo do controle neural (Figura 4-A) ; **Os músculos de força (The Fibrillar Indirect Flight Muscles –IFMs)** - constituem a maior parte do volume da musculatura no toráx e a função é quase exclusivamente gerar força para o vôo. Nesses músculos o tempo das contrações individuais é determinado pelas oscilações mecânicas do tórax e não pelos spikes no neurônio motor pré-sináptico (Figura 4-B). **Os músculos de direção (Steering Muscles)** - são controlados por neurônios motores. Embora representem uma pequena fração do volume total da musculatura, eles são cruciais no controle do vôo e permitem às moscas executarem rápidas e complexas manobras de vôo (Roeder , 1947).

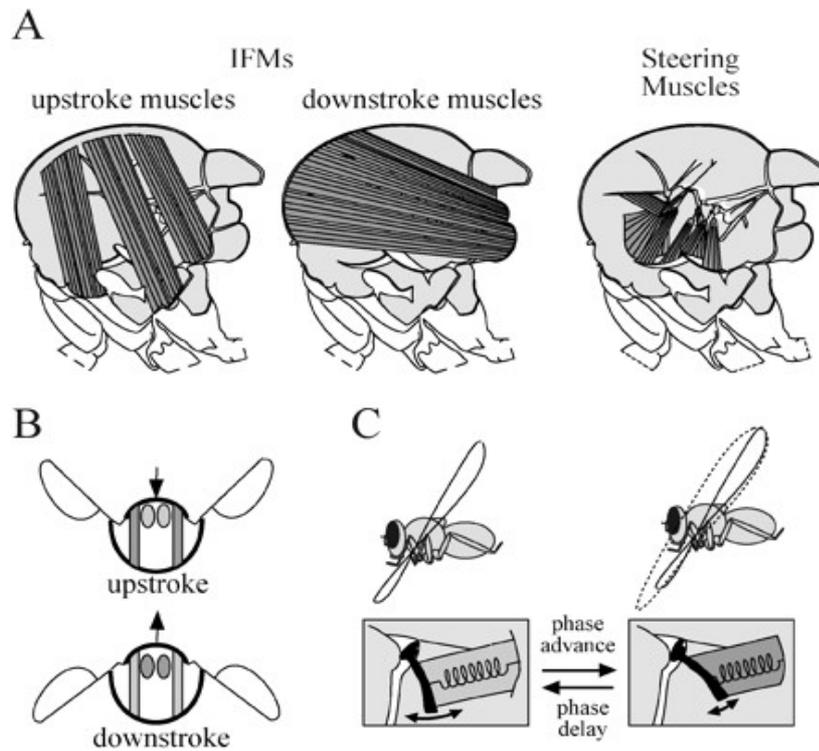


Figura 4 – Organização e função dos músculos de vôo da mosca. (A) Os músculos de força (The Fibrillar Indirect Flight Muscles – IFMs) são arranjados em dois grupos antagonistas. Pequenos músculos de direção estão localizados na base da asa. (B) Os IFMs controlam o padrão do movimento da asa . (C) Mudanças na fase de disparo dos músculos de direção produz sutis mudanças na batida da asa que altera o movimento . (Dickinson et al. , 1999).

Os músculos de direção alteram a direção mecânica da asa regulando assim como a energia mecânica do IFMs é transformado em movimento das asas. O papel desses músculos é portanto essencial no sistema de controle de vôo . Nosso interesse está justamente nos músculos de direção. As moscas batem as asas tão rápido que os músculos de direção só podem disparar um potencial de ação único dentro de cada ciclo de batida. Assim, os parâmetros importantes que controlam o vôo não é o número ou a frequência dos

potenciais musculares, mas sim se o músculo disparou ou não em um ciclo de batida da asa , e se isso acontecer, a fase de disparo (Figura 4-C) .

Se a fase de disparo determina as propriedades biomecânicas dos músculos da direção, e como consequência o movimento preciso das asas, o que sinaliza para os músculos quando podem disparar? Experimentos indicam que a fase de disparo do neurônio motor é acionada, não por um gerador de padrão central, mas sim por aferentes mecanossensoriais na basa da asa e dos halteres (órgãos conhecidos por dar estabilidade ao vôo) .

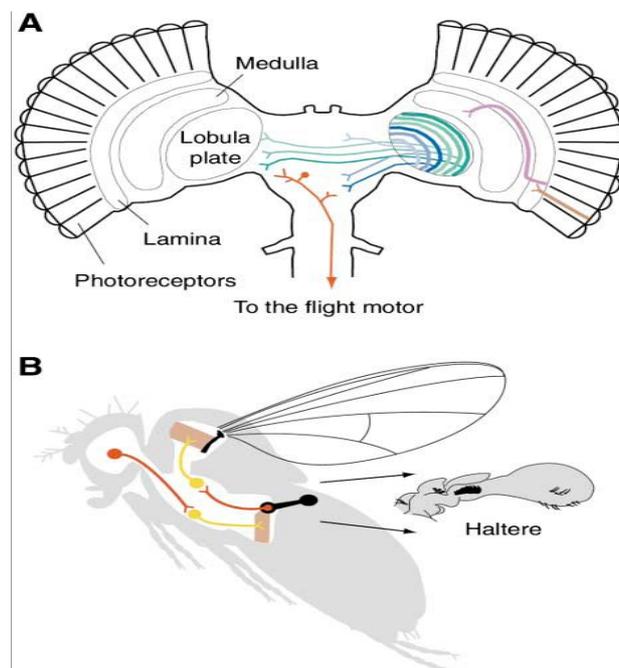


Figura 5 - (A) O fluxo ótico é transmitido (B) por interneurônios que levam a informação visual aos neurônios motores que inervam os músculos de direção na base do haltere. Os aferentes mecanossensoriais presentes na base do haltere fornecem o sinal elétrico de entrada para os neurônios motores que inervam os músculos na base da asa completando o circuito. (Neurônios sensoriais, indicados em vermelho, os neurônios motores indicados em amarelo, os músculos da direção indicados em marrom) (Dickinson, 1997).

As asas e halteres contêm estruturas embutidas no exoesqueleto sensíveis à mudança na tensão (Figura 5) . Em moscas, estes sensores fazem fortes conexões mono-sinápticas com os neurônios motores dos músculos da direção (Fayyazuddin & Dickinson, 1996.) e os sensores da asa são capazes de assegurar o disparo dos músculos em fases específicas dentro do ciclo de batida da asa (Fayyazuddin & Dickinson, 1999).

III. Captura, controle e criação

As moscas utilizadas no experimento são capturadas e criadas em nosso laboratório sob condições pré-determinadas a fim de garantir que não haja interferência nos resultados , por exemplo, da diferença de idade entre as moscas e/ou das condições ambientais que as cercam. Usando matéria orgânica em decomposição para atrair as moscas, as capturamos do meio ambiente e as colocamos em um balde fechado com açúcar , água e carne (fornecimento protéico necessário para o desenvolvimento ovariano das fêmeas adultas). As moscas depositam os ovos em um recipiente que contém uma ração preparada por nós, essa ração é a base de leite em pó , agar, levedura de cerveja, nipagin e caseína.

As moscas selvagens não são usadas nos experimentos, elas são retiradas do recipiente e esperamos até que os ovos eclodam em larvas, estas larvas vão se alimentar da ação e posteriormente serão colocadas em uma serragem seca para que tornem-se pupas (fase que dura 7 dias aproximadamente) até eclodirem e tornarem-se adultas (Figura 6).

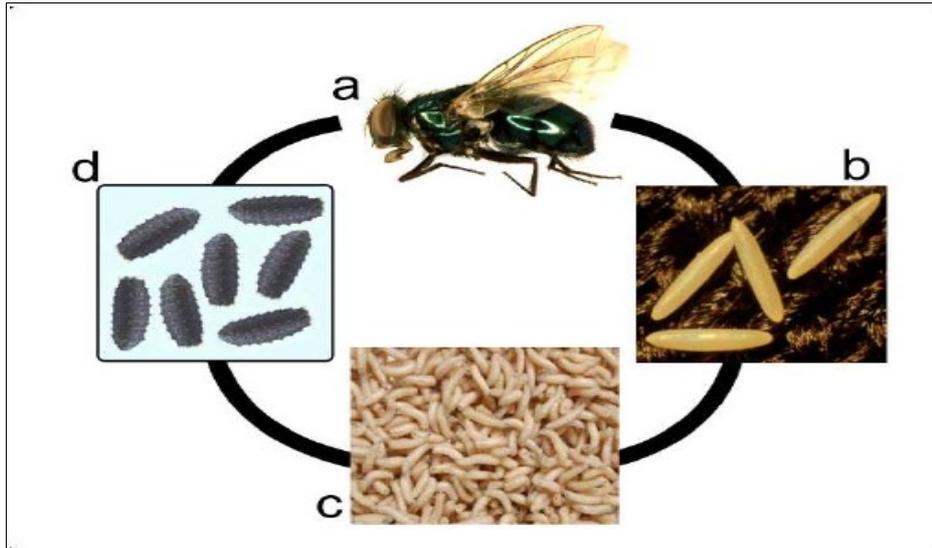


Figura 6 – Ciclo de vida da *Chrysomia megacephala*. (a) Mosca adulta. (b) Ovos. (c) Larvas. (d) Pupa.

IV. Aparato experimental

Três processos devem ser considerados no estudo da codificação neural da mosca integrando a atividade dos músculos controladores de direção e a atividade do H1: a geração do estímulo visual, aquisição da resposta neural do H1 e aquisição da resposta dos músculos de direção.

O gerador de estímulos visuais naturalístico consiste de um sistema de projeções de slides, um conjunto de lentes, dois espelhos e um motor linear que movimenta a imagem horizontalmente (Esteves, 2010). A imagem é projetada em um anteparo a partir de um sinal analógico de 0V a 5V fornecido pelo hardware dedicado (Figura 7) no computador hospedeiro que contém um arquivo com as sucessivas posições que a imagem ocupará numa taxa de 500 Hz. Esse arquivo de posições é gerado através de um software, integrando-se sequências de velocidades de valor médio zero e com o tempo

de correlação e desvio padrão previamente determinados pelo experimentador.

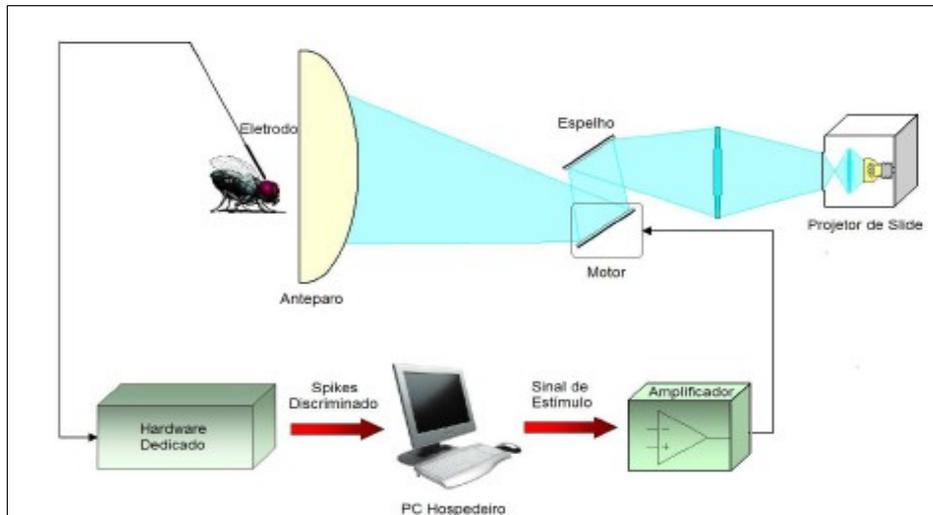


Figura 7 – Gerador de estímulos visuais naturalísticos (Esteves, 2010) .

Na aquisição do dado neural do H1 , a mosca será mantida dorsalmente presa com as asas e patas livres , a cabeça da mosca é mantida fixa ao tórax em uma posição que facilita o acesso a placa lobular. Uma microcirurgia é realizada com intuito de se remover o exoesqueleto protetor e a camada de gordura da parte posterior da cabeça permitindo o acesso ao H1 (figura 8).

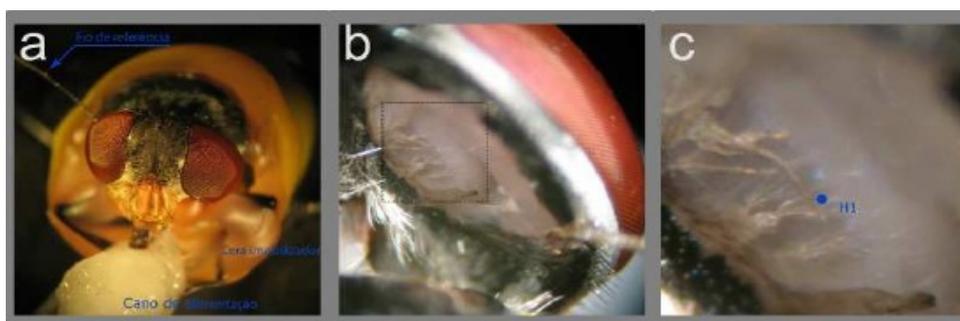


Figura 8 – Preparação da mosca para experimento. (a) A mosca é colocada em um tubo e imobilizada com cera. (b) Parte posterior da cabeça após ter sido retirada o exoesqueleto protetor e a camada de gordura. (c) localização aproximada do H1 (Mesquita, 2010) .

O sinal do neurônio é captado de forma extracelular por um microeletrodo de tungstênio de alta impedância posicionado em uma região próxima ao axônio. Os sinais captados variam em torno de 20-100 μ V. Com um micro-eletrodo capaz de captar um sinal de tão baixa amplitude, ruídos intrínsecos ou externos ao sistema acabam interferindo no sinal obtido e é necessário que o sinal seja processado adequadamente.

A Figura 9 mostra o sistema de aquisição de dados neurais. O front end analógico é a parte responsável por realizar o processamento analógico, através da captação, amplificação, filtragem e discriminação do sinal do neurônio, além disso o sistema ainda possui o hardware digital dedicado controlado por um computador hospedeiro que gera o sinal do estímulo que movimenta a imagem e registra os instantes em que ocorreram os spikes.

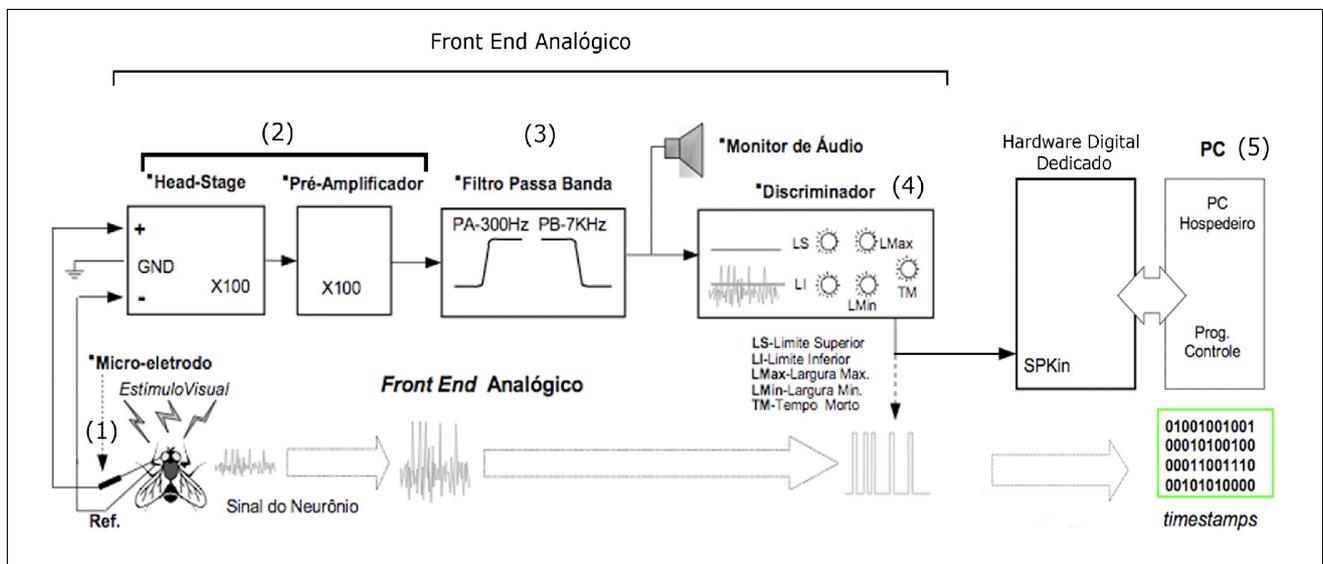


Figura 9 – Diagrama de blocos do Front End analógico.

O front end analógico é composto por : micro-eletrodo de tungstênio, amplificador AC diferencial localizado no primeiro estágio de tratamento do

sinal (o headstage) logo depois do micro-eletrodo com um ganho de voltagem de 100 vezes, um amplificador inversor com uma amplificação de 100 vezes, filtros do tipo Bessel de quarta-ordem , um monitor de áudio e um osciloscópio que atuam na monitoração do sinal captado e facilitam durante a localização do H1 e um discriminador analógico/digital que dispara um pulso no padrão TTL , quando recebe um sinal válido (definido pelo usuário que define uma janela com limiar superior (LS) e inferior (LI)) , e o envia para o hardware para ser registrado.

Para a aquisição dos músculos de direção dois eletrodos de tungstênio serão usados para captar o sinal dos músculos de direção de cada lado da mosca. O sinal será processado usando um amplificador diferencial A-M Systems modelo 1700 (A-M Systems, CA).

6. Dados e forma de análise dos resultados

Os dados obtidos consistirão de séries temporais simultâneas gravadas em computador da atividade do neurônio H1, registrada através de um eletrodo extracelular de tungstênio inserido na placa lobular da mosca, e da atividade diferencial dos músculos que controlam a direção do vôo , gravada através de dois eletrodos de tungstênio inseridos adequadamente no abdome do animal. Estes sinais serão gravados enquanto o animal observa uma imagem projetada que se move horizontalmente seguindo um padrão artificial complexo e reprodutível, armazenado em um computador gerador de estímulos.

A análise de dados será feita utilizando-se técnicas tradicionais de análise de dados em física como cálculo de correlações, espectros de fourier,

etc., e também ferramentas da Teoria da Informação como o cálculo da informação mútua média entre os sinais (Shannon, 1948; Rieke et al., 1997; de Ruyter van Steveninck, et al., 1997; Borst e Theunissen, 1999)

7. Bibliografia

Borst, A.; Theunissen, F. E. (1999): Information theory and neural coding, *Nature Neurosci.* 2, 947-957.

Borst, A.; Haag, J. Neural networks in the cockpit of the fly. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural and Behavioral Physiology*, v. 188, n. 6, p.419-437, 2002.

Castro, N. H. H. de. Multifractalidade no código neural da mosca. São Carlos: USP, 2008. Tese (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2008.

Dickinson, M. H. 1997. The control of steering behaviour by the haltere equilibrium system of *Drosophila*. *Soc. Neurosci.* 23:769.

Dickinson M. H. ; F. O. Lehmann, and S. J. Sane. 1999 A . Wing rotation and the aerodynamic basis of insect flight. *Science* 284:1954-1960.

Dickinson M. H. The Initiation and Control of Rapid Flight Maneuvers in Fruit Flies. *Integrative and Comparative Biology*. 2005;45(2):274-281.

Esteves, I. M. Gerador de estímulos visuais naturalísticos para pesquisar o sistema visual de moscas. São Carlos: USP, 2010 (a ser defendida) . Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós-Graduação em Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2010.

Farrow, K.; Haag, J.; Borst, A . Input organization of multifunctional motion-sensitive neurons in the blowfly. *Journal of Neuroscience*, v.23, n. 30, p.9805-9811, 2003.

Fayyazuddin, A . and M. H. Dickinson. 1996. Haltere afferents provide direct, electrotonic input to a steering motor neuron in the blowfly, *Calliphora*. *J. Neurosci.* 16:5225-5232 .

Fayyazuddin, A . and M. H. Dickinson. 1999. Convergent mechanosensory input structures the firing phase of a steering motor neuron in the blowfly, *Calliphora*. *J. Neurophysiol.* 82: 1916-1926 .

Franceschini, N. Retinal mosaic of the fly compound eye. In: Ali, M. A . (Ed.). *Photoreception and vision in invertebrates*. New York: Plenum Press, 1982. v.74.

Frye, M.A.; Dickinson, M.H. Fly flight: a model for the neural control of complex behaviour. *Neuron*, v.32,n.3,p. 385-388, 2001.

Gazziro, M. A . Desenvolvimento e implementação de instrumentação eletrônica para criação de estímulos visuais para experimentos com o duto óptico da mosca. São Carlos: USP, 2009. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2009.

Mesquita, N. F. Acuidade visual e codificação neural da mosca *Chrysomya Megacephala*. São Carlos: USP, 2010. 102 p. Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2010.

Müsseler, J.; Wühr, P.; Danielmeier, C., Zysset, S. (2005): Action-induced blindness with lateralized stimuli and responses, *Exp. Brain Res.* **160**, 214-22.

Pinto, R.D., Elson, R.C., Szucs, A., Rabinovich, M.I., Selverston, A.I., 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.

Rieke, F., Warland, D., van Steveninck, R. R. e Bialek, W. (1997): *Spikes - Exploring the neural code*, MIT press, London, England.

Rob R. de Ruyter van Steveninck, et al.(1997): Reproducibility and Variability in Neural Spike Trains, *Science* **275**, 1805-1808.

Roeder D. Movements of the thorax and potential changes in the thoracic muscles of insects during flight. 1947:95-106.

Shannon, C. E. (1948): The mathematical theory of communication, *Bell Syst. Tech. J.* **27**, 379-423.

Kirschfeld, K. The visual system of the fly: physiological optics and functional anatomy as related to behaviour. In: Schmitt, F.O.; Worden, F.G. (Ed.). *The neurosciences 4 th study program*. Cambridge: MIT Press, 1979.

Wallis, T.S.; Arnold, D.H. (2009): Motion-induced blindness and motion streak suppression, *Curr. Biol.* **19**, 325-329.

São Carlos, 18 de agosto de 2010.

Carolina Menezes Silvério

Reynaldo Daniel Pinto
orientador