

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

Projeto de Mestrado apresentado à FAPESP

**Protocolos de aplicação de drogas em
tempo real e dependente do padrão a
centros geradores de padrões motores:
efeitos de serotonina (5-HT) e glutamato no
sistema nervoso estomatogástrico de
Callinectes sapidus.**

Jessica dos Santos

Orientador: Reynaldo Daniel Pinto

São Carlos
2010

Resumo

A maioria dos trabalhos encontrados na literatura sobre o efeito de drogas em circuitos nervosos consistem em observar o comportamento dos neurônios quando submetidos, por um determinado período, a diferentes concentrações constantes da droga que se deseja estudar, seguido de um período de eliminação da droga (wash). Entretanto, durante o funcionamento normal de um sistema nervoso, a maioria dos neurônios não é submetida a neuromodulação ou à aplicação estacionária de neurotransmissores, mas sim à um padrão de pulsos de estímulo consistindo de pequenas quantidades da droga liberada de maneira descontínua e dependente do funcionamento do próprio circuito. Além disso, já se sabe atualmente que mesmo os menores e mais simples circuitos nervosos são sistemas complexos em que o padrão observado depende do todo e não pode ser entendido como uma superposição de efeitos lineares de suas partes constituintes. O objetivo deste projeto de mestrado é usar técnicas da Física para estudar experimentalmente a influência do neuromodulador serotonina (5-HT) e do neurotransmissor glutamato no sistema nervoso estomatogástrico (STG) de *Callinectes sapidus* (gerador central de padrões – CPG pilórico) durante sua operação normal “in vitro”, quando usamos um protocolo de estímulo em tempo real e dependente do padrão produzido pelo próprio CPG.

1. Introdução e Justificativa

Substâncias neuromoduladoras estão envolvidas na regulação de aspectos importantes do comportamento, além de controlar uma variedade de funções fisiológicas, mediadas por receptores específicos (SOSA et al., 2004). Por isso, os moduladores neurais vêm sendo cada vez mais estudados, afim de elucidar questões de como alteram as propriedades dos neurônios, em cultura ou em sistemas nervosos, fazendo-se a análise do padrão sináptico (CRUZ-BERMUDÉZ e MARDER, 2007).

Podendo produzir múltiplos e contraditórios efeitos moduladores sobre a força da transmissão sináptica, a serotonina (5-HT), em muitos estudos, vêm sendo analisada tanto em circuitos nervosos de vertebrados, quanto em invertebrados (CRUZ-BERMUDÉZ e MARDER, 2007; LEE et al., 2008; SPITZER et al., 2008; GRASHOW et al., 2009). Em crustáceos, a 5-HT pode facilitar e diminuir a transmissão das sinapses, no entanto, o efeito que se manifesta durante a aplicação, bem como o sinal e duração dos efeitos que podem continuar por muito tempo após interromper o fornecimento de 5-HT, pode depender do histórico de aplicação, bem como sobre a concentração (LEE et al., 2008).

O sistema nervoso estomatogástrico (STG) dos crustáceos, o qual tem sido intensamente estudado por mais de 30 anos, possui a característica de fornecer *in vitro*, os mesmos padrões do sistema *in vivo* (MULLONEY e SELVERSTON, 1974; SELVERSTON et al., 1976; SELVERSTON e MOULINS, 1986). Tal característica permite estudar os efeitos de neuromoduladores, aplicados externamente ao gânglio, com o sistema nervoso em placa de Petri.

Com o auxílio de um *picospritzer* (aparelho capaz de borrifar os neurônios com quantidades da ordem de picolitros de drogas - McCaman et al., 1977) desenvolvido em nosso laboratório, produziremos um padrão de injeção de drogas dependente do padrão de saída do circuito nervoso analisado em tempo real por um programa do tipo dynamic clamp. Iremos utilizar dois tipos de drogas: serotonina (5-HT), que tem a função de neuromodulador no circuito e glutamato que atua como um neurotransmissor inibidor dos neurônios.

Acreditamos que desenvolvendo técnicas adequadas de utilização do *picospritzer* para o fornecimento de 5-HT e glutamato em pequenas quantidades e dependendo do padrão de saída, poderemos analisar como essas drogas modificam em tempo real o comportamento dos centros geradores de padrões do STG durante seu funcionamento.

2. Objetivos

O objetivo deste projeto de pesquisa é treinar a estudante em técnicas multidisciplinares de dissecação, preparação de sistemas biológicos e análise de dados de experimentos, interagindo computadores e circuitos nervosos vivos, onde estudaremos os efeitos da 5-HT e de glutamato em protocolos de injeção dependentes do padrão produzido pelo sistema nervoso estomatogástrico de crustáceos – siris azuis *Callinectes sapidus*.

3. Proposta de trabalho

Durante a execução deste projeto de pesquisa, a estudante irá aprender e adaptar as técnicas de dissecação e preparação do sistema nervoso estomatogástrico do crustáceo *Callinectes sapidus* para medidas extra e intracelulares dos neurônios do CPG pilórico do STG de *Callinectes sapidus* durante a injeção de drogas dependente do padrão de saída do próprio CPG.

Utilizaremos um *picospritzer* controlado por computador para aplicar pulsos de 5-HT e glutamato nas proximidades dos neurônios do gânglio estomatogástrico. O mesmo computador usado para controlar o *picospritzer* irá escolher em tempo real qual o padrão de pulsos de drogas que utilizará, baseando-se na atividade produzida pelo STG medida extracelularmente. O programa utilizado para produzir em tempo real o padrão de estímulos em função da atividade do STG será desenvolvido em nosso laboratório, modificando-se uma versão baseada no protocolo dynamic clamp (Pinto et al., 2001), em que produzimos sinapses artificiais entre neurônios biológicos e neurônios virtuais.

4. Cronograma de execução

O cronograma proposto para este projeto de mestrado é:

Primeiro Ano de Vigência da Bolsa:

- Cursar as disciplinas para obter os créditos necessários para o mestrado;
- Aprender as técnicas de dissecação e preparação de sistema nervoso estomatogástrico de *Callinectes sapidus*;
- Realizar experimentos e adaptar técnicas de utilização do *picospritzer*;
- Estudo do referencial teórico que será utilizado na análise dos dados;
- 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;
- 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

Os siris-azuis da espécie *Callinectes sapidus* utilizados nos experimentos são obtidos diretamente de pescadores na cidade de Iguape-SP. Os animais são alimentados 3 vezes por semana com peixe e mantidos em um tanque de 1000 l de água salobra (sal Red Sea), com sistemas de filtragem e remoção de proteínas, que comporta até 80 animais separadamente. No planejamento de experimentos e determinação do número de animais, durante os experimentos e no período de manutenção dos animais em cativeiro, serão observados os princípios éticos propostos pela Society for Neuroscience e pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFSCar, sobre o manuseio de animais vivos.

Durante a execução deste projeto de pesquisa, a estudante irá utilizar técnicas padrão de dissecação do sistema nervoso estomatogástrico de siris *Callinectes sapidus*, assim como técnicas eletrofisiológicas de medidas intra e extracelulares de neurônios de invertebrados, que se encontram descritas em detalhes em (Selverston e Moulins, 1986; Selverston et al., 2001).

A preparação (Figuras 1, 2), consistindo do gânglio estomatogástrico (STG), seus principais nervos motores e gânglios superiores (gânglios comissurais – COGs e gânglio esofágico - OG) mantidos com a finalidade de fornecer a neuromodulação basal in vitro necessária para o funcionamento do STG durante muitas horas, é fixada por pinos de aço inóx a uma placa de Petri com fundo revestido com elastômero de silicone (SILGARD 184, DuPont) e mantida sob uma perfusão constante de solução fisiológica à temperatura controlada, conforme mostrado na Figura 2B.

vez que um pulso é produzido pelo computador uma gotícula de solução fisiológica com droga é borrifada na direção dos neurônios. Desse modo podemos produzir um padrão complexo de estímulos baseado na atividade neural medida em tempo real.

Diferentes protocolos (padrões) de estímulos serão escolhidos através da programação do computador de medida/estímulo. Podemos, por exemplo, aplicar um pulso de glutamato (inibidor) toda vez que ocorrer o quarto spike de um burst de um dos neurônios e verificar como este pulso altera o padrão original. O controle do picospritzer em tempo real é dependente do padrão de saída do circuito nervoso será feito através de um programa do tipo dynamic clamp modificado (Pinto et al., 2001).

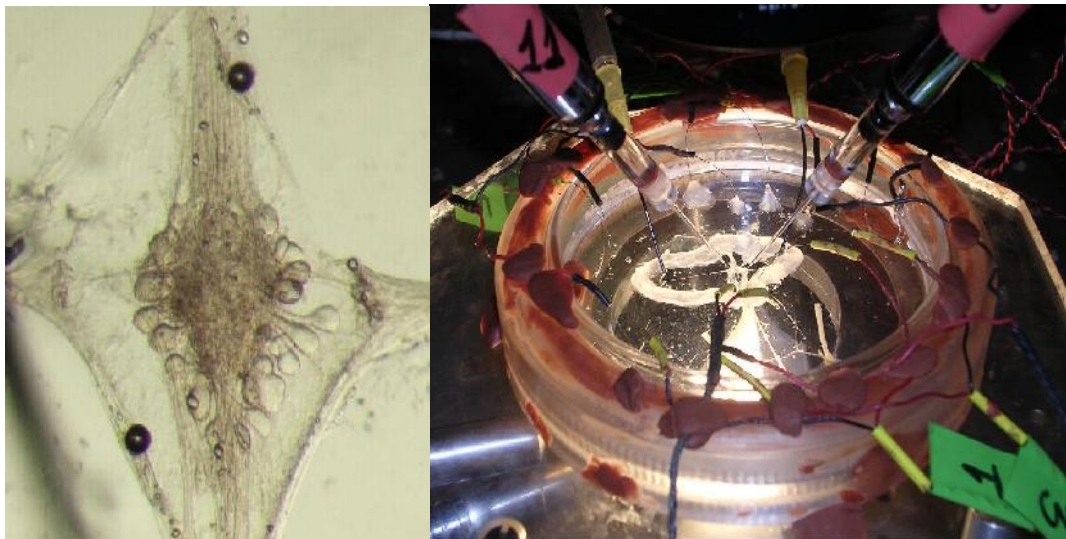


Figura 2. A – Gânglio estomatogástrico após fixação em placa de Petri. B – Sistema nervoso estomatogástrico fixado à placa de Petri e eletrodos intra e extracelulares.

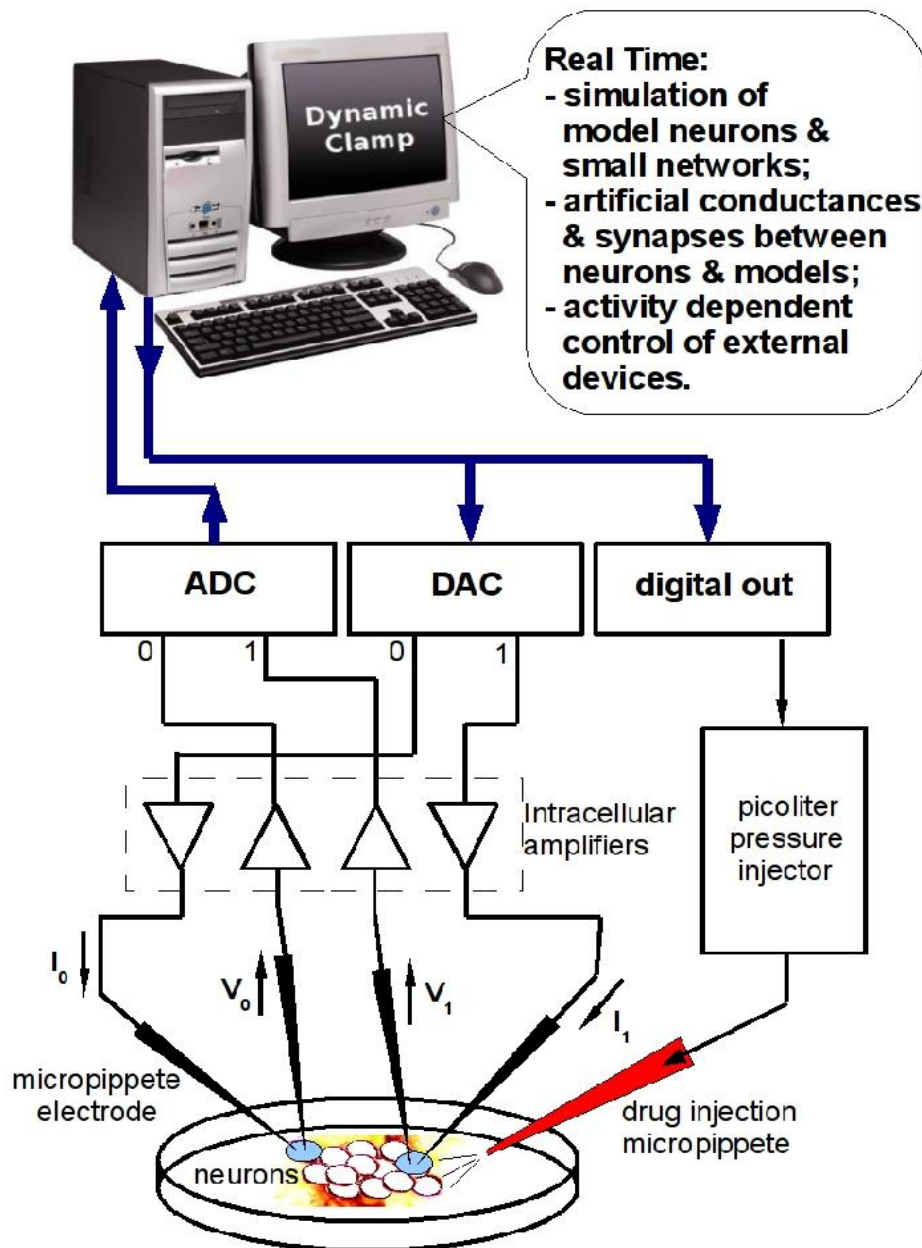


Figura 3. Diagrama de um experimento típico com um protocolo moderno do tipo *dynamic-clamp*. Através de interfaces ADC e DAC conectadas a eletrodos intracelulares o computador pode medir o potencial de membrana dos neurônios vivos e injetar corrente nestes a uma alta taxa de atualização (dezenas de 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.

6. Dados e forma de análise dos resultados

Os dados obtidos consistirão de séries temporais gravadas em computador da atividade dos neurônios do CPG pilórico do STG, registradas extracelularmente e simultaneamente com a série temporal dos padrões de estímulo (disparo do picospritzer - injeção de drogas).

A análise dos dados será feita utilizando-se técnicas clássicas de análise (gráficos, espectros de potência, etc...), assim como técnicas de análise de sistemas dinâmicos não-lineares (mapas de retorno, cálculo de expoentes de Lyapunov, etc.) (Abarbanel, 1996), e técnicas da Teoria de Informação (cálculo da informação mútua média entre os padrões de estímulo e resposta do circuito neural) (Shannon, 1948; Rieke et al., 1997; de Ruyter van Steveninck, et al., 1997; Borst e Theunissen, 1999)

7. Referências

- Abarbanel, H. D. I. (1996): *Analysis of Observed Chaotic Data*, Springer-Verlag, New York.
- Borst, A. e Theunissen, F. E. (1999): Information theory and neural coding, *Nature Neurosci.* **2**, 947-957.
- Cruz-Bermudéz, N.D., Marder, E. (2007): Multiple modulators act on the cardiac ganglion of the crab, *Cancer borealis*. *The Journal of Experimental Biology*. **210**:2873-2884.
- Grashow, R., Brookings, T., Marder, E. (2009): Reliable neuromodulation from circuits with variable underlying structure. *PNAS* **106**:11742-11746.
- Lee, S.H.; Taylor, K.; Krasne, F.B. (2008): Reciprocal stimulation of decay between serotonergic facilitation and depression of synaptic transmission. *Journal of Neurophysiology*. **100**:1113-1126.
- McCaman, R. E., McKenna, D. G., and Ono, J. K. (1977): A pressure system for intracellular and extracellular ejections of picoliter volumes, *Brain Research* **136**, 141-147.
- Mulloney, B; Selverston, A.I. (1974): Organization of the stomatogastric ganglion of the spiny lobster. *Journal of Comparative Physiology A* **91**:33-51.
- 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.
- Selverston, A.I.; Russell, D.F.; Miller, J.P. (1976): The stomatogastric nervous system: structure and function of a small neural network. *Progress in Neurobiology* **7**, 215-290.
- Selverston, A.I.; Moulins, M. (1986): *The crustacean stomatogastric system: a model for the study of central nervous systems*. Springer-Verlag, Berlin.
- Selverston, A. I., Rabinovich, M. I., Abarbanel, H. D. I., Elson, R., Szucs, A., Pinto, R. D., Huerta, R., e Varona, P. (2001): Reliable circuits form irregular neurons: a dynamical approach to understanding central pattern generators, *J. Physiol. (Paris)* **94**, 357-374.
- Shannon, C. E. (1948): The mathematical theory of communication, Bell Syst. Tech. J. **27**, 379-423.

Sosa, M.A; Spitzer, N.; Edwards, D.H.; Baro, D.J. (2004): A crustacean serotonin receptor: Cloning and distribution in the thoracic ganglia of crayfish and freshwater prawn. *The Journal of Comparative Neurology*. **473**, 526-537.

Spitzer, N.; Edwards, D.S.; Baro, D.J. (2008): Conservation of structure, signaling and pharmacology between two serotonin receptor subtypes from decapod crustaceans, *Panulirus interruptus* and *Procambarus clarkii*, *The Journal of Experimental Biology* **211**, 92-105.

São Carlos, 15 de março de 2010.

Jessica dos Santos

Reynaldo Daniel Pinto
orientador