

# Agradecimentos

Ao Reynaldo pela orientação entusiástica e pela amizade.

Ao Sartorelli pela orientação no início do trabalho e pelas inúmeras críticas construtivas, não somente no campo profissional.

Ao Pedro Carelli pela ajuda no desenvolvimento do trabalho, pelas produtivas discussões e pela ajuda na revisão do texto.

Ao Tiago Pereira pelo companheirismo, pelas discussões sempre muito produtivas e pelas sugestões para a versão final da tese.

À minha tia Eunice que gentilmente realizou a revisão gramatical do texto.

Aos companheiros de grupo Thiago, Viviane, Juliano, Ludmila, Tufaille, Adriana, Rogério, Daniel, Caroline e Boris, por proporcionarem sempre um agradável ambiente de trabalho e jantares fabulosos sempre muito bem humorados.

À Elisandra pela paciência e pelo apoio incondicional, principalmente nos momentos mais críticos no final do trabalho.

Ao Fábio Paolini pela convivência harmoniosa fora do ambiente de trabalho e pelo apoio em tantas situações.

Aos vigias Silvio, João Gouveia e Wilson pelos cafés e pelos longos e agradáveis bate-papos durante as madrugadas.

Ao Rafi pela enorme ajuda durante a minha estada em San Diego.

Aos meus amigos Ricardo Bussotti, Hirata e Rene Medrano pelas conversas nos momentos difíceis e pelos conselhos sempre encorajadores.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

A todos os demais que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho e que eu deixei de citar, mas que, se me conhecem, sabem que não é por mal.

A Elisabete e José, meus  
pais, com muito  
carinho.

# Resumo

Realizamos simulações computacionais de modelos da atividade elétrica de centros geradores de padrões para investigar o fato experimental de organismos vivos utilizarem neurônios caóticos para produzir padrões periódicos. Centros geradores de padrões biológicos produzem atividades motoras periódicas que devem ser robustas a pequenas flutuações das propriedades dos neurônios e sinapses, mas também flexíveis para permitir a neuromodulação do ritmo.

Utilizamos principalmente dois modelos de atividade neural, um modelo fenomenológico do tipo Hindmarsh-Rose e um modelo baseado em condutâncias do tipo Hodgkin-Huxley. Realizamos também experimentos com redes híbridas, conectando dois tipos de neurônios do gânglio estomatogástrico de crustáceos aos neurônios modelo, que confirmaram os resultados obtidos nas simulações.

Observamos o comportamento das redes principalmente em função de dois parâmetros: um que controla a atividade intrínseca dos neurônios e outro que representa a condutância máxima das sinapses químicas usadas para formar a rede. As redes apresentam atividade robusta e flexível quando os neurônios que as compõem apresentam comportamento intrínseco entre rajadas e tônico. Esta é a região onde os neurônios modelo apresentam comportamento caótico, o que é uma evidência do motivo de se observar este tipo de comportamento em neurônios isolados do gânglio estomatogástrico dos crustáceos.

Mostramos que o modelo tipo Hodgkin-Huxley, apesar de mais realista do ponto de vista eletrofisiológico, não apresenta um comportamento coletivo satisfatório em termos de flexibilidade e robustez. Os experimentos com redes híbridas evidenciaram como deveria ser modificado o modelo para que o comportamento coletivo fosse restaurado.

Investigamos também outros aspectos da atividade neural: a obtenção de padrões oscilatórios com neurônios que não apresentam comportamento intrinsecamente oscilatório e a influência de perturbações causada por ruídos na atividade neural.

# Abstract

We have performed computational simulations of models of the neural electrical activity of central pattern generators in order to investigate the experimental fact that living organisms use chaotic neurons to produce periodic patterns. Biological central pattern generators produce periodic motor activity that must be robust to small fluctuations in the neural and synaptic properties, but they must also be flexible to allow rhythm neuromodulation.

We have used mainly two different models of neural activity, one phenomenological Hindmarsh-Rose type and another conductance based Hodgking-Huxley type. We have also performed experiments with hybrid networks, connecting two types crustacean stomatogastric ganglion neurons with the model neurons, which confirmed the results obtained with the simulations.

We have simulated the network behavior as a function of two parameters: the maximal conductance of the chemical synapses by which neurons are connected and a parameter that controls the intrinsic behavior of the neurons. The networks present robust and flexible activity when the neurons have intrinsic behavior between bursting and tonic. This is the region in which model neurons present chaotic behavior, what is an evidence of why chaotic behavior takes place in isolated neurons from the stomatogastric ganglion (STG) of crustaceans.

We have shown that the Hodgking-Huxley type model does not perform a satisfactory collective behavior in terms of flexibility and robustness, in spite of its electrophysiological realism. Experiments with hybrid networks showed how the model should be modified in order to restore the proper collective behavior.

We have also investigated other aspects of the neural activity: the observation of oscillatory patterns in networks composed by neurons which are not endogenous bursters and the influence of perturbations in the neural activity caused by noise.

# Índice

<a href="#">1. Introdução.....</a>	<a href="#">7</a>
<a href="#">2. Neurônios e redes neurais biológicas.....</a>	<a href="#">14</a>
<a href="#">2.1. Neuromoduladores.....</a>	<a href="#">31</a>
<a href="#">2.2. Redes de inibição recíproca.....</a>	<a href="#">32</a>
<a href="#">3. Sistemas dinâmicos.....</a>	<a href="#">35</a>
<a href="#">3.1. Estabilidade estrutural.....</a>	<a href="#">41</a>
<a href="#">4. Modelos de atividade neural e de sinapses.....</a>	<a href="#">46</a>
<a href="#">4.1. O modelo de Hodgkin e Huxley.....</a>	<a href="#">47</a>
<a href="#">4.2. Modelos gerais baseados no formalismo de Hodgking-         Huxley.....</a>	<a href="#">51</a>
<a href="#">4.3. O modelo HH1C.....</a>	<a href="#">53</a>
<a href="#">4.4. O modelo de Hindmarsh e Rose.....</a>	<a href="#">55</a>
<a href="#">4.5. Modelo de conexão sináptica.....</a>	<a href="#">58</a>
<a href="#">5. Metodologia.....</a>	<a href="#">60</a>
<a href="#">5.1. Métodos Numéricos.....</a>	<a href="#">60</a>
<a href="#">5.1.1. Modelo SN (axônio + IH).....</a>	<a href="#">60</a>
<a href="#">5.1.2. Modelo HR.....</a>	<a href="#">62</a>
<a href="#">5.1.3. Modelo HH2C.....</a>	<a href="#">63</a>
<a href="#">5.1.4. Modelo HHIH.....</a>	<a href="#">65</a>
<a href="#">5.1.5. Integração das equações e análise dos dados .....</a>	<a href="#">67</a>
<a href="#">5.2. Métodos experimentais.....</a>	<a href="#">73</a>
<a href="#">5.3. Construção de redes neurais híbridas - o protocolo         Dynamic Clamp .....</a>	<a href="#">85</a>
<a href="#">6. Resultados Numéricos.....</a>	<a href="#">89</a>
<a href="#">6.1. Caracterização do comportamento dos neurônios         isolados.....</a>	<a href="#">89</a>
<a href="#">6.2. Acoplamentos de dois neurônios.....</a>	<a href="#">102</a>
<a href="#">6.2.1. Redes com o modelo SN.....</a>	<a href="#">102</a>

6.2.2. Redes com o modelo HR.....	103
6.2.3. Redes com o modelo HH2C.....	112
6.2.4. Redes com o modelo HHH.....	116
6.2.5. Dependência do parâmetro $\tau_s$ .....	122
6.3. Acoplamentos de três neurônios.....	134
6.3.1. Redes com o modelo HR.....	135
6.3.2. Redes com o modelo HH2C.....	143
6.3.3. Redes com o modelo HHH.....	148
6.4. Introdução de perturbações nas variáveis dinâmicas	151
7. Resultados experimentais - redes neurais híbridas.....	155
7.1. Freqüência dos neurônios acoplados em função da condutância sináptica.....	155
7.1.1. Neurônios biológicos conectados a um neurônio HR .....	155
7.1.2. Neurônios biológicos conectados a neurônios HH2C .....	156
7.2. Restaurando o ritmo de um CPG gástrico de crustáceo usando o modelo SN.....	163
8. Conclusão.....	166
9. Referências.....	174
10. Apêndices.....	178

# 1.Introdução

Os seres vivos estão entre as estruturas mais complexas conhecidas. Boa parte da complexidade destes organismos está nas diversas maneiras com que eles interagem com o meio que os cerca, captando informações, processando-as e reagindo a elas. Em todos os organismos mais desenvolvidos a maioria destas atividades é realizada por circuitos compostos por células capazes de produzir e processar impulsos elétricos: os neurônios.

Quando Hodgkin e Huxley (1952) desvendaram a origem da atividade elétrica neural, elaborando pela primeira vez um modelo baseado em medidas eletrofisiológicas, surgiu a esperança de que seríamos capazes de descrever o comportamento dos neurônios através de equações matemáticas. Esta compreensão dos mecanismos físicos envolvidos na atividade neural e a sua descrição em termos de equações relativamente simples trouxeram a possibilidade de fazer previsões, justificando as diversas tentativas de incluir nos modelos cada vez mais detalhes da atividade dos neurônios. Entretanto, se por um lado uma visão reducionista pode nos levar a acreditar que entendendo muito bem as partes podemos compreender o todo, por outro lado cabe a pergunta: até onde o conhecimento detalhado de cada um dos neurônios e da forma com que eles se comunicam pode revelar algo sobre o comportamento de um sistema tão complexo como um ser vivo? Embora seja inegável que muitos passos foram dados desde Hodgkin e Huxley, esta pergunta permanece sem resposta.

Existem diversas abordagens que visam compreender o comportamento dos neurônios e das redes neurais, do nível molecular ao nível comportamental. Em todas estas abordagens

existem desafios científicos relevantes em aberto (Kandel *et al.*, 2003). Em muitos casos, não é claro como o conhecimento de cada um dos diferentes níveis de descrição pode ser reunido para a elaboração de uma teoria comum.

Enquanto uma abordagem biofísica procura entender detalhadamente os mecanismos estruturais e de funcionamento dos canais iônicos, da comunicação neural e da transmissão sináptica, uma abordagem sistêmica parte da análise da atividade de neurônios individuais e grupos de neurônios buscando entender quais são os mecanismos que os levam a desempenhar funções mais sofisticadas, tais como atividade motora e sensorial (Marder, 1998). A complexidade de cada uma das abordagens e o acesso de cada uma delas a dados experimentais de naturezas diferentes fazem com que estas sejam duas áreas pouco interagentes (Marder, 1998). Entretanto, parte da dificuldade na interação reside no fato de que são poucos os casos em que podemos isolar um conjunto funcional (órgão, tecido, rede neural, etc.) para o estudo do funcionamento de suas partes.

Neste ponto, o estudo de redes neurais mais simples desempenha um papel fundamental na elucidação de fenômenos neurológicos. Exemplos de tais redes são os centros geradores de padrões, circuitos neurais presentes em vertebrados e invertebrados e que são responsáveis por gerar padrões temporais para desempenhar tarefas repetitivas, tais como andar, correr, mastigar, entre outras. Estas redes funcionam quase independentemente de estímulos externos e, em alguns casos, podem ser removidas do animal sem que a sua atividade seja alterada significativamente.

Este é o caso do gânglio estomatogástrico (STG) dos crustáceos (Selverston e Moulins, 1987; Selverston *et al.*, 1976), um dos tecidos nervosos que se tornou um paradigma de vários



aspectos da gênese e da modulação de centros geradores de padrões (Selverston e Moulins, 1987).

Um fato interessante a respeito do STG dos crustáceos foi a observação experimental de que os neurônios desta rede apresentam comportamento caótico quando isolados de suas conexões sinápticas (Abarbanel *et al.*, 1996). Isto levantou uma questão interessante a respeito dos mecanismos que a natureza usa para alcançar o comportamento final: porque uma rede neural que desempenha tarefas repetitivas e regulares é formada por elementos que são intrinsecamente caóticos? Esta questão, juntamente com a surpreendente habilidade dos sistemas caóticos de sincronizar seus comportamentos (Pecora e Carroll, 1990), foram a matéria-prima para diversas publicações especulando sobre as vantagens de construir redes neurais com neurônios intrinsecamente caóticos (Rabinovich e Abarbanel, 1998; Rabinovich *et al.*, 1997). Segundo os autores, redes formadas por neurônios caóticos poderiam estabelecer um repertório maior de comportamentos e transitar mais eficientemente entre eles do que redes compostas por neurônios regulares.

Por outro lado, à luz das numerosas e recentes descobertas sobre sistemas dinâmicos não-lineares, onde a instabilidade e a irregularidade na natureza parecem ser mais uma regra do que uma exceção seria surpreendente que o comportamento dos neurônios, individualmente ou em conjunto, fosse sempre regular e previsível (Rabinovich e Abarbanel, 1998). A dinâmica não-linear e intrincada com que os canais iônicos geram a atividade elétrica neural torna o neurônio um sistema extremamente suscetível ao comportamento caótico.

Além disto, os neurônios e redes neurais são sistemas que apresentam comportamento complexo (Glass, 1995), ou seja, possuem propriedades coletivas aparentemente inconsistentes com

as interações entre as partes, como por exemplo moléculas d'água que, em situações particulares, formam estruturas extremamente complexas como de um floco de neve. De maneira similar, diversas redes que desempenham tarefas complicadas são formadas por neurônios que não têm atividade espontânea, ou seja, toda a complexidade observada na rede surge como uma propriedade coletiva emergente, oriunda da excitabilidade de cada neurônio e das conexões sinápticas entre eles. Por outro lado, neurônios que apresentam comportamento intrínseco irregular podem produzir padrões periódicos simples quando conectados em redes.

Não obstante esta complexidade, diversos autores defendem a possibilidade de descrever o comportamento coletivo dos neurônios construindo modelos baseados em medidas experimentais detalhadas da atividade de neurônios isolados. Entretanto, até o momento estas tentativas parecem não ter tido muito sucesso. Modelos atuais detalhados da atividade intrínseca do neurônio LP do STG são baseados principalmente em dois conjuntos de dados experimentais, um de Golowasch e Marder (1992) e o outro de Turrigiano *et al.*, (1995). No entanto, os modelos decorrentes direta ou indiretamente destas medidas (Falcke *et al.*, 2000; Bushholtz *et al.*, 1992; Guckenheimer *et al.*, 1997; Huerta *et al.*, 2000; Nowotny, 2004; Liu *et al.*, 1998; Goldman *et al.*, 2001; Prinz *et al.*, 2003a) apresentam comportamentos dinâmicos completamente distintos entre si e muitos deles não modificam seus comportamentos de maneira similar quando parâmetros similares são variados (Nowotny, 2004). Isto é uma evidência de que o acesso a dados experimentais supostamente detalhados dos mecanismos que geram a atividade neural não necessariamente leva a modelos que tenham correspondências entre si, e nem mesmo com a própria evolução temporal do potencial de membrana dos neurônios biológicos.

Vários estudos, teóricos e experimentais, mostram evidências de que o controle do comportamento dos neurônios não ocorre através do ajuste fino de cada um dos componentes que participam da atividade neural, mas sim através de mecanismos gerais de controle do nível de atividade (Marder, 1998). Tais mecanismos seriam capazes de balancear as diversas correntes que compõem a atividade do neurônio, mantendo-a inalterada. Desta maneira, por princípio, não existiria um modelo de neurônio, mas sim uma classe de modelos capazes de desempenhar atividades similares.

Idéias similares foram aplicadas também ao comportamento de redes como o STG dos crustáceos (Prinz *et al.*, 2004), onde se especula que a atividade da rede poderia ser alcançada por múltiplas e diferentes combinações de comportamentos intrínsecos dos neurônios e das configurações das conexões sinápticas. Estas evidências sugerem a impossibilidade de usar abordagens reducionistas para estudar a atividade neural.

Assim, existem abordagens que procuram descrever o comportamento neural de maneira mais geral, baseadas em princípios da dinâmica neural (Izhikevich, 2000; Rabinovich *et al.*, 2005). A universalidade revelada pela teoria de sistemas dinâmicos torna esta teoria bastante adequada à descrição de sistemas neurais. Particularmente, idéias como a estabilidade estrutural de modelos e a teoria de bifurcações, podem dar contribuições interessantes para o entendimento do processo neural (Rabinovich *et al.*, 2005).

Izhikevich (2000) mostrou uma possível classificação dos modelos de atividade neural de acordo as propriedades dinâmicas que determinam a excitabilidade nos modelos. O autor mostra como certos comportamentos neurais são produzidos em termos de propriedades geométricas do espaço de fases, tais como a proximidade de bifurcações, órbitas periódicas e pseudo-periódicas,

etc., independentemente do modelo utilizado. Entretanto, modelar neurônios e redes neurais usando esta abordagem possui sérias limitações sob o aspecto da capacidade preditiva. Existe uma quantidade enorme de modelos que podem gerar comportamentos similares, porém, somente alguns deles podem descrever o comportamento neural. A única maneira de conseguirmos filtrar os modelos plausíveis é através da comparação com resultados experimentais.

Por outro lado, tentar elaborar modelos simplesmente a partir de medidas experimentais e de princípios fundamentais da arquitetura neural, tem se mostrado impraticável. Neste ponto, a procura por mecanismos mais gerais do funcionamento neural, baseada em requisitos dinâmicos que os neurônios devem possuir, pode ser um guia para a identificação dos detalhes experimentais mais importantes para a elaboração dos modelos.

Acreditamos que o intercâmbio de informações dos experimentos e das duas abordagens teóricas seja fundamental para abrir novas perspectivas em termos de modelagem de neurônios e de redes neurais. Uma ferramenta que tem se tornado cada vez mais importante neste contexto, e que acreditamos ser um ponto importante deste trabalho, é a criação de redes híbridas (Szücs *et al.*, 2000; Pinto *et al.*, 2000; Prinz *et al.*, 2004). Tais redes podem ser produzidas utilizando o protocolo conhecido como *dynamic clamp* (Pinto *et al.*, 2001), que permite conectar neurônios modelo em tempo real com neurônios biológicos, como se existissem sinapses entre eles.

Desta forma, procuramos nortear esta tese de doutoramento não apenas pela fenomenologia envolvida nas redes como o STG dos crustáceos, nem apenas pela busca dos elementos dinâmicos importantes para o comportamento coletivo dos neurônios mas, principalmente, pela interação entre estes dois aspectos e pela

utilização de redes neurais híbridas como um teste para a capacidade que os diferentes modelos têm de produzir o comportamento coletivo observado em redes neurais biológicas.

## 2. Neurônios e redes neurais biológicas

Os seres vivos interagem com o ambiente em que vivem de maneira extremamente complexa. Muitos dos vários processos envolvidos nesta interação, desde a captação de informações provenientes do meio externo, sua propagação através do corpo, seu processamento e finalmente uma resposta ao estímulo sob a forma de alguma atividade motora, são realizados por neurônios.

Todas as células vivas possuem um potencial de membrana da ordem de  $-70\text{mV}$  em relação ao meio exterior. Entretanto, as células nervosas, ou neurônios, têm a capacidade de alterar ativamente este potencial de membrana e comunicar esta alteração às outras células. Esta habilidade que os neurônios possuem é a característica que os distingue das demais células.

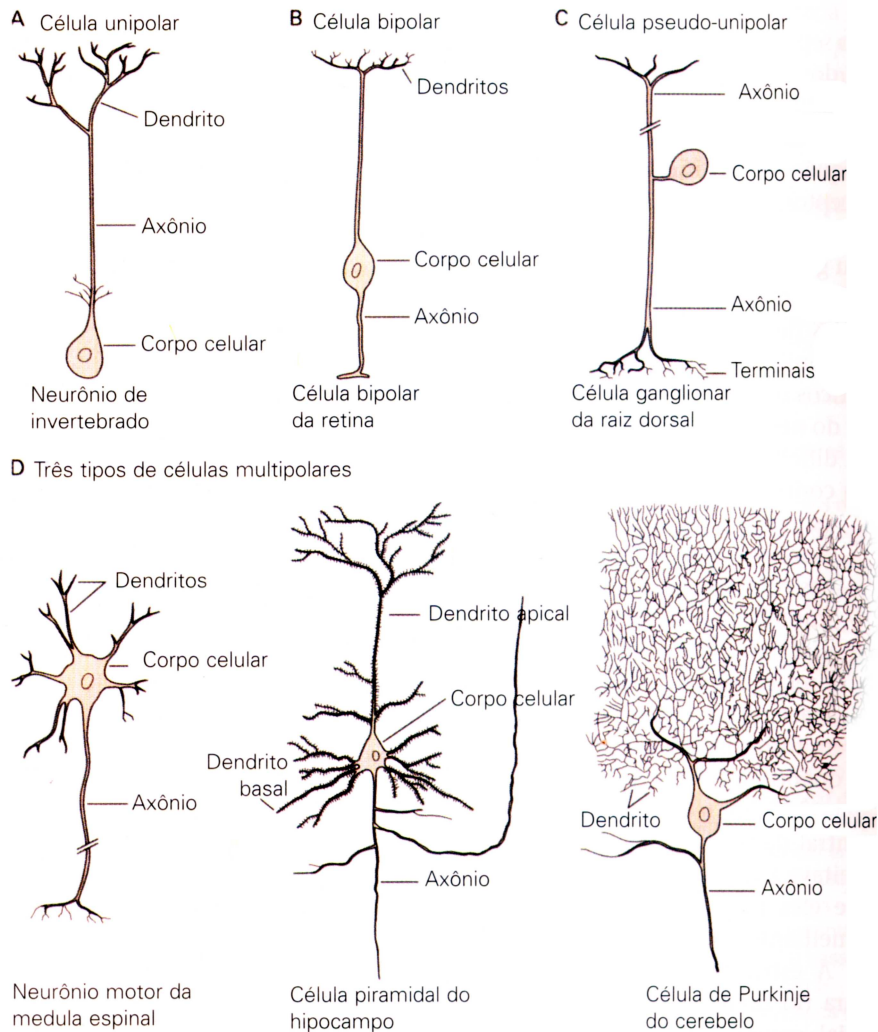
A Fig. 2.1 mostra alguns tipos de neurônios. Em termos da estrutura morfológica, os diversos tipos de neurônios apresentam algumas estruturas em comum, como o axônio e os dendritos.

O axônio consiste em um prolongamento tubular da célula que é capaz de conduzir sinais elétricos rapidamente ao longo do seu comprimento, partindo do soma. O local onde o axônio se conecta ao corpo celular é chamado de cone de implantação e, em geral, é também onde é iniciado o sinal que é propagado pelo neurônio.

Os dendritos são processos neurais que tendem a ser mais curtos que os axônios e geralmente bastante ramificados (Bear *et al.*, 2002), dando origem a uma densa rede de prolongamentos denominada árvore dendrítica. A estrutura dos dendritos permite que eles recebam e integrem os sinais provenientes de outros

neurônios e, em alguns casos, podem desempenhar também o papel de propagar sinais para outras células.

Outra estrutura que tem um papel fundamental na comunicação celular é a sinapse, que será detalhada posteriormente.



**Fig. 2.1: Diversos tipos de neurônios encontrados em diversos seres vivos e suas estruturas mais comuns. Extraída de Kandel et al. (2003).**

A parede celular é uma membrana hidrofóbica, impermeável e isolante, formada por lipídios, que separa o meio aquoso intracelular (citossol) do fluido extracelular (Fig. 2.2). A impermeabilidade da membrana permite que as concentrações de íons e de outras substâncias sejam bastante diferentes dentro e fora da célula. Estas

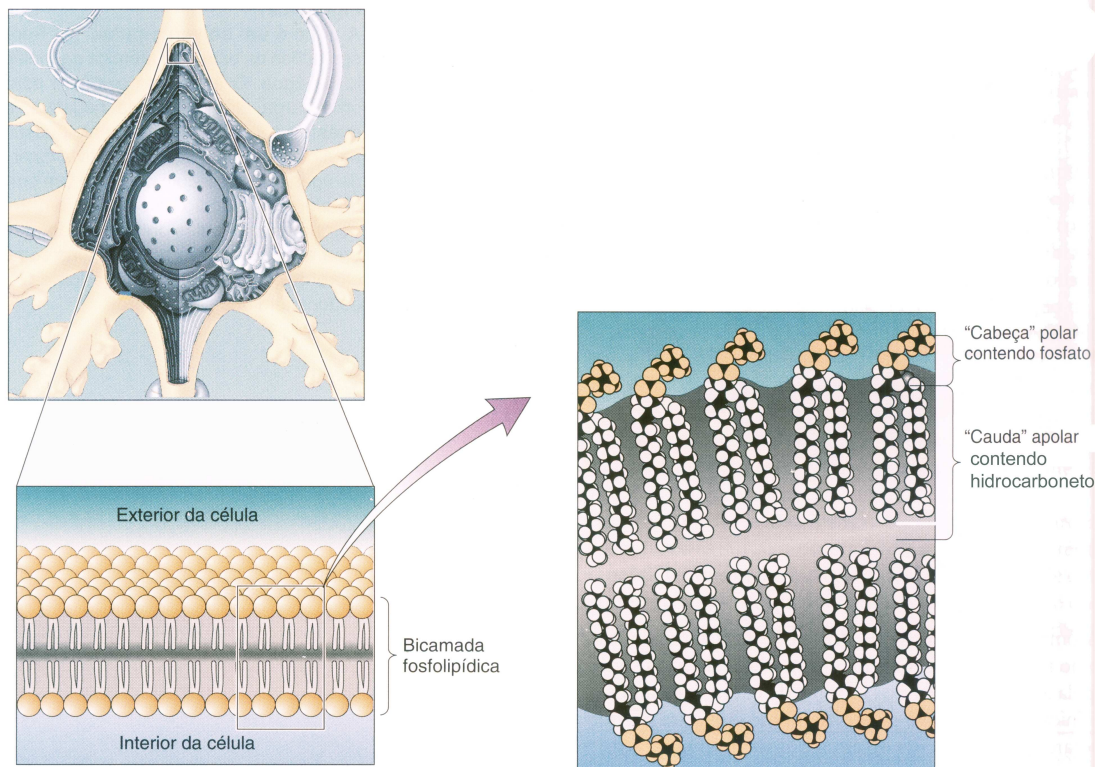
diferenças também são possíveis devido à existência de bombas iônicas na membrana celular, estruturas ativas responsáveis por manter o desequilíbrio de concentrações dos íons.

Com a diferença de concentrações iônicas nos meios intra e extracelulares, surge um potencial químico que tende a equilibrar estas concentrações. Já o desbalanço da quantidade de cargas elétricas portadas pelos íons dá origem a um potencial elétrico ao longo da membrana celular.

A atividade elétrica neural é basicamente um jogo dinâmico de sucessivas mudanças na permeabilidade da membrana, fazendo com que os íons fluam através dela impulsionados pelos potenciais elétrico e químico. Esta dinâmica, geralmente bastante complexa, só é possível por existirem canais iônicos na membrana celular, elementos que permitem a passagem seletiva de íons. Além disto, a maneira ativa com que estes canais respondem a mudanças do potencial elétrico intracelular são a chave para o funcionamento do maquinário neural.

Manter as diferenças de concentrações entre os meios intra e extracelular é uma tarefa de vital importância para qualquer tipo de célula, e estas concentrações são controladas finamente. A Tabela 1 mostra as concentrações típicas de alguns íons no axônio gigante da lula.





**Fig. 2.2: Detalhes da membrana fosfolipídica bipolar que separa o meio intra do extracelular. Os lipídios se arranjam formando uma barreira hidrofóbica, impermeável e isolante elétrica. Adaptado de Bear *et al.*, 2002.**

Ion	Citoplasma (mM)	Fluido extra-celular (mM)	Potencial de equilíbrio (mV)
$K^+$	400	20	-75
$Na^+$	50	440	55
$Cl^-$	52	560	-60

**Tabela 1: Concentrações típicas para o axônio gigante da lula de diversos íons no citoplasma e no meio extracelular e o potencial de Nernst que esta diferença de concentração proporciona. Dados retirados de Kandel *et al.* (1995).**

Suponhamos um recipiente no qual existem dois tipos de íons e uma parede que divide o recipiente em duas partes. Suponhamos também que a concentração de cada tipo de íon seja diferente em cada uma das partes do recipiente, mas que cada uma delas ainda esteja em equilíbrio de cargas. Abrindo um orifício que deixa passar somente íons de um tipo, estes fluem da região de maior para a de

menor concentração devido ao potencial químico. Este fluxo de íons, por outro lado, causa um desequilíbrio de cargas entre as partes do recipiente, e conseqüentemente uma diferença de potencial elétrico. O fluxo de íons termina no momento em que o potencial químico se iguala ao elétrico, levando o sistema a um equilíbrio (Fig. 2.3). É interessante observar que o número de cargas que devem fluir através da membrana para estabelecer um potencial elétrico equivalente ao potencial químico é muito pequena, causando uma modificação desprezível nas concentrações.

**Fig. 2.3: (a) Membrana impermeável separando os meios intra e extracelulares que contêm concentrações salinas diferentes mas em equilíbrio elétrico. (b) A inserção de um canal iônico que permite a passagem somente de moléculas de Na<sup>+</sup> causa um fluxo inicial destas moléculas para a região de menor concentração devido ao potencial químico. (c) O fluxo de moléculas de Na<sup>+</sup> causa uma diferença de potencial elétrico entre as duas regiões até que este se iguala ao potencial químico, alcançando o equilíbrio dinâmico onde o número líquido de moléculas que atravessa o canal iônico é nulo. Adaptado de Bear *et al.*, 2002.**

A equação que determina o potencial elétrico decorrente de um processo mostrado na Fig. 2.3 em função das concentrações iônicas é chamada de equação de Nernst:

$$E_{ion} = \frac{RT}{ZF} \ln \left( \frac{[ion]_e}{[ion]_i} \right) \quad (2.1)$$

onde  $E_{ion}$  é o potencial de equilíbrio,  $R$  é a constante dos gases,  $T$  é a temperatura absoluta,  $F$  é a constante de Faraday,  $Z$  é a valência do íon e  $[ion]_{e(i)}$  é a concentração externa (interna) do íon. A Tabela 1 mostra os valores dos potenciais de Nernst para alguns íons no axônio gigante da lula.

A extensão desta equação para quando mais de um tipo de íon é envolvido no processo de equilíbrio é chamada de equação de

Goldman e inclui uma ponderação proporcional à permeabilidade relativa da membrana aos diversos íons.

$$V_m = \frac{RT}{ZF} \ln \left( \frac{\sum_j P_j [I_j]_e}{\sum_j P_j [I_j]_i} \right) \quad (2.2)$$

onde os colchetes significam concentração da substância,  $P_j$  são as permeabilidades relativas de cada um dos íons  $I_j = \text{Na}^+, \text{K}^{++}, \text{Cl}^-$ , etc., que participam do processo de equilíbrio e  $V_m$  é a diferença de potencial elétrico na membrana.

Em um neurônio típico, em equilíbrio elétrico, podemos calcular o potencial de membrana através das permeabilidades relativas da membrana e das concentrações iônicas mostradas na Tabela 1. Se levarmos em conta somente os íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , e sabendo que a permeabilidade da membrana ao  $\text{K}^+$  é em torno de 40 vezes maior do que ao  $\text{Na}^+$ , chegamos ao valor de  $V_m = -65 \text{ mV}$ , que é muito próximo do potencial de repouso típico de um neurônio.

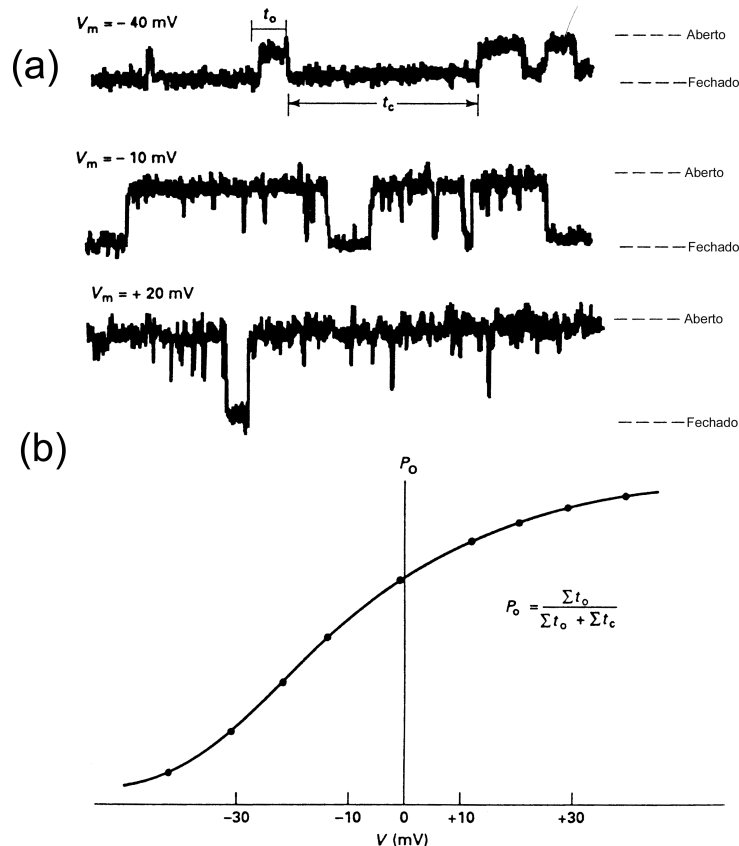
A equação de Goldman fornece um resultado para sistemas que estão em equilíbrio, o que geralmente não é o caso dos neurônios durante suas atividades regulares. Os elementos fundamentais para gerar as atividades oscilatórias do potencial de membrana celular são os canais iônicos.

Estes canais têm a propriedade de conduzir íons através da membrana celular de forma seletiva, ou seja, cada tipo de canal iônico é permeável somente a um determinado tipo de íon. Como exemplos, temos canais que permitem somente a passagem de íons de sódio e outros que permitem somente a passagem de potássio.

Além da seletividade, os canais iônicos podem modificar suas conformações obstruindo a passagem dos íons. Dizemos que o canal iônico pode se encontrar nos estados aberto ou fechado. Estas mudanças dependem de diversos fatores, como o potencial de

membrana celular (responsáveis por boa parte da atividade neural) e a presença de substâncias químicas.

Cada canal iônico apresenta um comportamento estocástico, modificando aleatoriamente seu estado de aberto (quando conduz íons) para fechado (quando não conduz íons) e vice-versa. O tempo que o canal fica aberto ou fechado depende do potencial de membrana (Fig. 2.4). Como a abertura ou fechamento dos canais são eventos independentes, ou seja, a atividade de cada canal não influencia a atividade dos demais, para um número suficientemente grande de canais iônicos, temos um comportamento médio bem determinado. Desta forma, é possível simplificar o problema e calcular a condutância total para um determinado íon como o número médio de canais abertos multiplicado pela condutância de cada canal, em função do potencial de membrana. Esta medida (Fig. 2.4) caracteriza a dependência de voltagem dos canais iônicos, peça chave para a elaboração de modelos determinísticos da atividade neural.

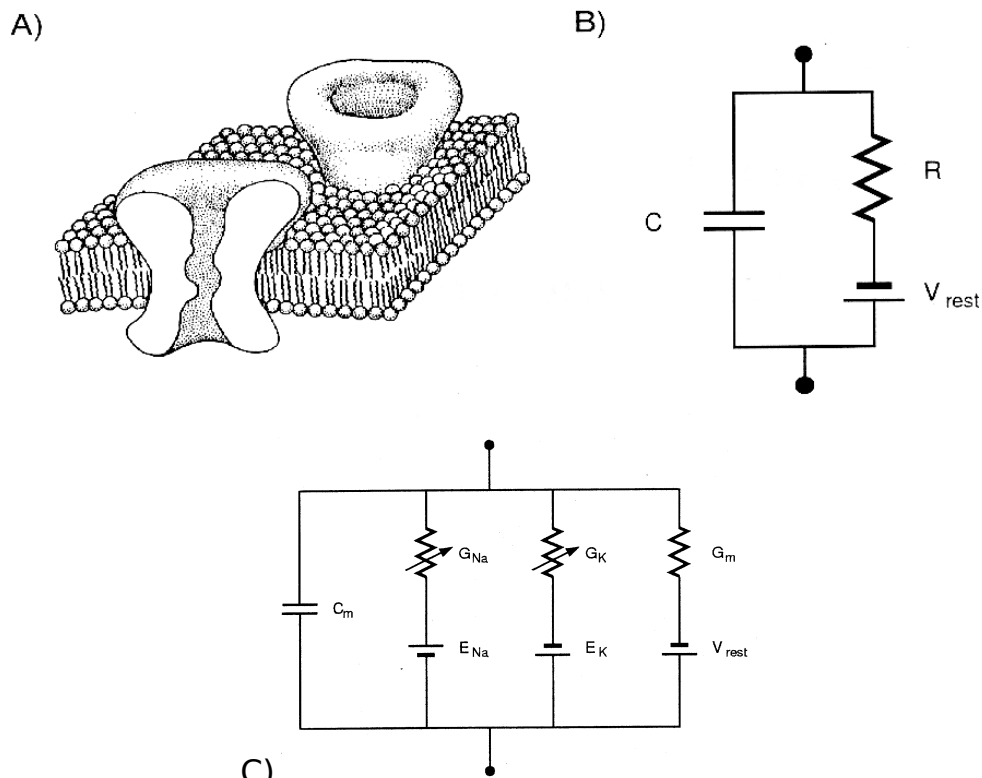


**Fig. 2.4: (a) Medidas de corrente elétrica de um único canal iônico para três valores diferentes do potencial de membrana mostrando as transições aleatórias entre os estados aberto e fechado e como o tempo que o canal fica em cada estado varia com o potencial de membrana. (b) Curva média da probabilidade de encontrar um canal aberto em função do potencial de membrana.**

Como o número de canais iônicos é em geral suficientemente grande para que a média de canais abertos seja uma medida bastante precisa, daqui em diante vamos nos referir ao comportamento dos canais iônicos como o seu comportamento médio, a não ser que seja explicitado de forma contrária.

Uma maneira de modelarmos este mecanismo é através de um circuito elétrico equivalente. Neste circuito, a membrana impermeável é representada por um capacitor, os canais iônicos são modelados como resistências elétricas e os potenciais químicos, que impelem cada tipo de íon para a região de menor concentração, são modelados como baterias. A Fig. 2.5 mostra dois esquemas de circuitos equivalentes a uma membrana neural. A aparente

simplicidade do modelo logo desaparece quando verificamos a grande quantidade de diferentes tipos de íons que podem compor a atividade de um único neurônio e, ainda, a dependência essencialmente não-linear da condutância sináptica dos canais iônicos em relação ao potencial de membrana.



**Fig. 2.5: A) Secção da membrana celular mostrando como os canais iônicos se posicionam. B) Circuito elétrico que modela a atividade elétrica passiva da membrana celular, descrevendo sua característica capacitiva e o potencial (de Nernst) que surge pela diferença de concentração de íons entre os meios intra e extracelular e pela permeabilidade da membrana a estes íons. C) Circuito equivalente que inclui as propriedades ativas da membrana que possui canais iônicos de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  dependentes de voltagem e uma corrente de fuga, que tende a levar o potencial da célula para o potencial de repouso.**

A membrana neural é um sistema excitável. Isto significa que pequenas perturbações elétricas são atenuadas, mas perturbações que ultrapassam uma amplitude crítica fazem com que o potencial de membrana produza uma oscilação rápida e estereotipada, cuja forma não depende da perturbação. Esta oscilação é chamada de

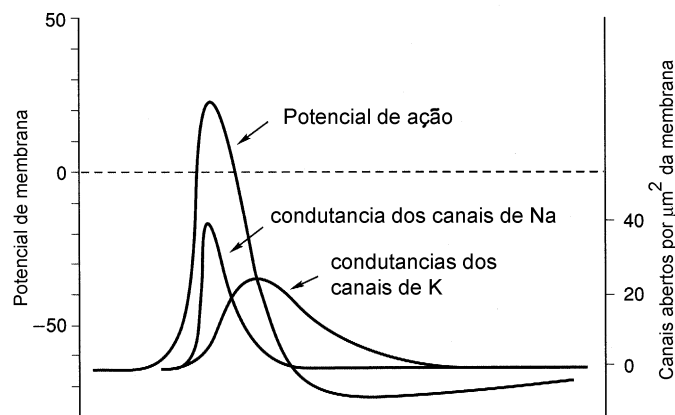
potencial de ação e tem como principal característica seu comportamento do tipo tudo-ou-nada, ou seja, uma vez iniciada, a oscilação sempre acontece da mesma maneira. O potencial de ação tem um papel muito importante tanto na propagação dos sinais elétricos para regiões mais longas das terminações nervosas como também na comunicação neural. A seguir descrevemos sucintamente como os elementos que compõem a membrana celular cooperam para a produção do potencial de ação.

Os canais iônicos mais importantes para a formação do potencial de ação são os de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ . Como vimos na Tabela 1 para o axônio da lula (o que também é válido para diversos outros neurônios), a concentração de  $\text{Na}^+$  é muito maior no fluido extracelular enquanto o  $\text{K}^+$  é muito mais concentrado no citosol.

Quando o potencial de membrana de um neurônio é aumentado até um valor denominado limiar de disparo, os canais de  $\text{Na}^+$  sofrem uma mudança de estado e começam a se abrir, permitindo a passagem destes íons através da membrana. Duplamente impulsionados pela diferença de concentração e pela diferença de potencial elétrico, os íons  $\text{Na}^+$  entram na célula muito rapidamente, o que causa um abrupto crescimento do potencial de membrana. Em seguida, por uma característica própria dos canais de  $\text{Na}^+$ , eles começam a se fechar, permanecendo em um estado inativo, e fazendo com que o crescimento do potencial cesse, e o potencial atinja o seu máximo. Simultaneamente ao crescimento do potencial de membrana, os canais de  $\text{K}^+$  dependentes de voltagem começam a se abrir. Esta mudança, no entanto, acontece de maneira muito mais lenta do que para os canais de  $\text{Na}^+$ . Quando a condutância dos canais de  $\text{K}^+$  aumenta, ela faz com que os íons fluam para fora da célula e ocasiona a diminuição do potencial de membrana, que chega até valores inferiores ao potencial de repouso da célula, pois os canais de  $\text{Na}^+$  ainda permanecem

inativos. Este período é conhecido como período refratário, onde o neurônio não dispara potenciais de ação mesmo sendo estimulado com correntes despolarizantes fortes. Quando a condutância dos canais de  $K^+$  vai decaindo, o potencial vai retornando lentamente ao potencial de repouso. A Fig. 2.6 mostra as curvas de ativação dos canais de  $Na^+$  e  $K^+$  durante um potencial de ação.

Maiores detalhes sobre a modelagem da atividade neural podem ser vistos na seção 4.



**Fig. 2.6: Condutâncias relativas dos canais de  $Na^+$  e  $K^+$  responsáveis pela formação do potencial de ação. A abertura dos canais de  $Na^+$  é mais rápida que a dos canais de  $K^+$  e esta diferença permite que o potencial tenha uma subida rápida, até a ativação dos canais de  $K^+$ , que fazem com que o potencial diminua novamente.**

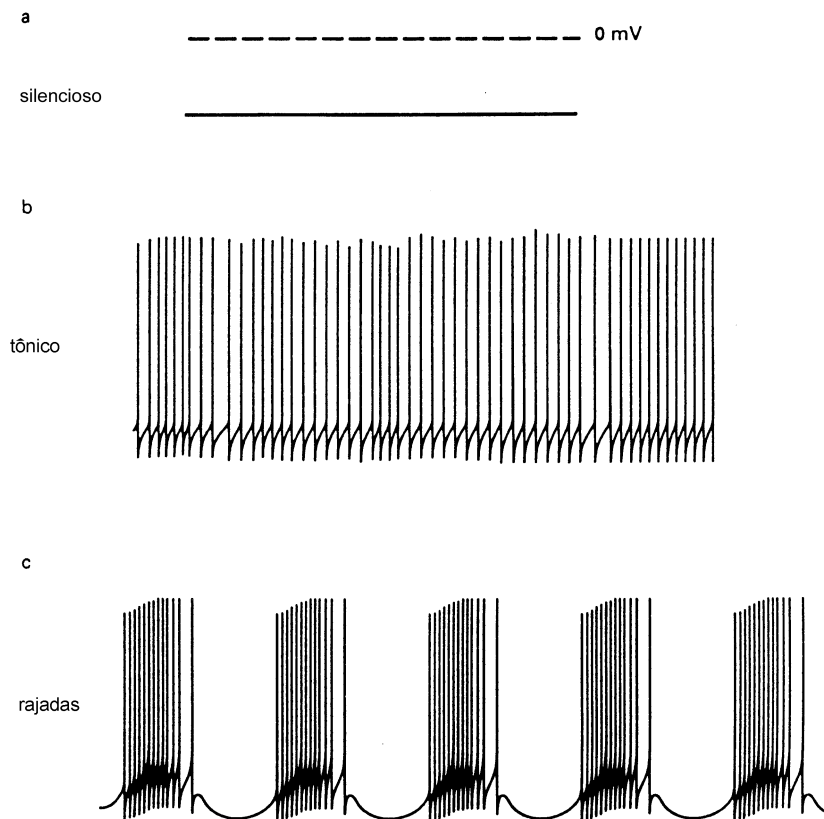
Apesar do potencial de ação ter esta forma estereotipada e ser um evento comum a quase todos os neurônios, existem muitos outros padrões oscilatórios que estas células podem apresentar. Esta variedade de comportamentos é possível devido à presença de diversos outros canais iônicos além dos permeáveis a  $Na^+$  e  $K^+$ , tais como canais de  $Ca^{+2}$ ,  $Cl^-$ , entre outros. Existem também determinados canais que respondem a faixas específicas do potencial de membrana, como é o exemplo dos canais responsáveis pela corrente de hiperpolarização  $I_H$ . O comportamento de alguns canais pode ser também regulado pela concentração de íons no meio intracelular, além da dependência do potencial de membrana,



como é o caso dos canais de  $K^+$  dependentes da concentração de cálcio [Ca].

Esta variedade de combinações de tipos de canais iônicos, cada um com uma dependência específica em relação ao potencial de membrana ou a concentrações iônicas, gera um número gigantesco de possibilidades para o comportamento de um único neurônio.

Os neurônios são classificados também em relação à sua atividade elétrica individual. Segundo esta classificação os neurônios podem ser disparadores endógenos ou silenciosos. Os neurônios silenciosos não disparam potenciais de ação quando isolados, somente quando são estimulados. Os neurônios que são disparadores endógenos disparam potenciais de ação espontaneamente em padrões que podem ser em rajadas ou tônico (Fig. 2.7).

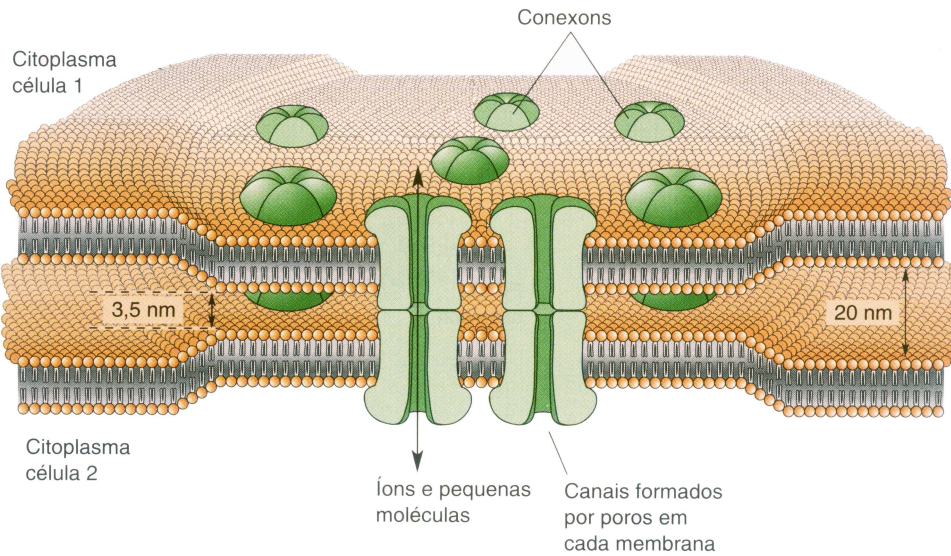


**Fig. 2.7: Tipos de comportamentos elétricos que neurônios podem apresentar. Os neurônios silenciosos não disparam potenciais de ação na ausência de estímulos. Os neurônios que apresentam comportamento tônico disparam potenciais de ação permanentemente em intervalos aproximadamente regulares. Os neurônios que apresentam comportamento em rajadas disparam trens de potenciais de ação seguidos por pausas nas quais o potencial de membrana hiperpolariza. Tanto os neurônios que apresentam comportamento tônico como os que apresentam comportamento em rajadas são chamados de disparadores endógenos.**

Assim como a atividade elétrica intrínseca dos neurônios, a comunicação entre eles se dá através do fluxo de íons pela membrana celular. No caso da comunicação, no entanto, o fluxo de íons ocorre em regiões diferenciadas da membrana celular que são denominadas de sinapses. Através destas, um neurônio é capaz de induzir modificações no potencial de membrana de um outro neurônio, processo pelo qual costumamos dizer que os neurônios se comunicam.

Em termos da estrutura morfológica das sinapses, podemos dividi-las em dois principais grupos, as sinapses elétricas e as químicas.

As sinapses elétricas são mais simples em termos do seu funcionamento e se formam quando as membranas celulares de dois neurônios se aproximam, a uma distância típica de  $3,5 \text{ nm}$ , compartilhando canais iônicos. Estes canais possuem uma grande condutância, em torno de  $100 \text{ pS}$  e conseqüentemente são permeáveis a íons e a outras substâncias mais complexas, formando uma espécie de duto conectando os dois meios intracelulares (Fig. 2.8). Geralmente estes canais iônicos são passivos, ou seja, não ocorre nenhum tipo de modulação da sua condutância e as substâncias e íons podem passar através deles permanentemente. Mas existem casos em que estes canais apresentam condutâncias dependentes de voltagem, resultando em uma transmissão unidirecional. Nestes casos a condução só é efetiva da célula pré para a pós-sináptica e as sinapses são chamadas de retificadoras (Kandel *et al.*, 1995). Além disto, existem sinapses elétricas que têm suas propriedades condutivas controladas por substâncias químicas (segundos mensageiros).



**Fig. 2.8: Porção das membranas celulares de dois neurônios que estabelecem uma sinapse elétrica. Nesta região, os canais iônicos se alinham formando um duto entre as duas células por onde podem passar íons e algumas outras substâncias. Adaptado de Bear *et al.*, 2002.**

Nas sinapses químicas as células que se comunicam não compartilham canais iônicos, como é o caso das sinapses elétricas. Ao contrário, nas sinapses químicas as paredes dos dois neurônios podem distar mais do que a distância típica entre neurônios, mantendo-se a uma distância que varia de 20 a 40 nm. A região intermediária das membranas que formam a sinapse é denominada de fenda sináptica e é onde acontecem os processos químicos relativos à comunicação neural.

Na sinapse química, a propagação do sinal é unidirecional, fluindo de uma célula para a outra. A célula de onde partem os estímulos é chamada de célula pré-sináptica e a célula que sofre os estímulos decorrentes da comunicação é chamada de célula pós-sináptica.

A Fig. 2.9 mostra a estrutura típica de uma sinapse química. Podemos observar que as estruturas existentes nas células pré e pós-sinápticas são bem diferentes. Na célula pré-sináptica localizam-se algumas vesículas que contêm substâncias chamadas

neurotransmissores. A membrana da célula pós-sináptica apresenta uma grande quantidade de canais iônicos que produzirão o efeito do estímulo destes neurotransmissores.

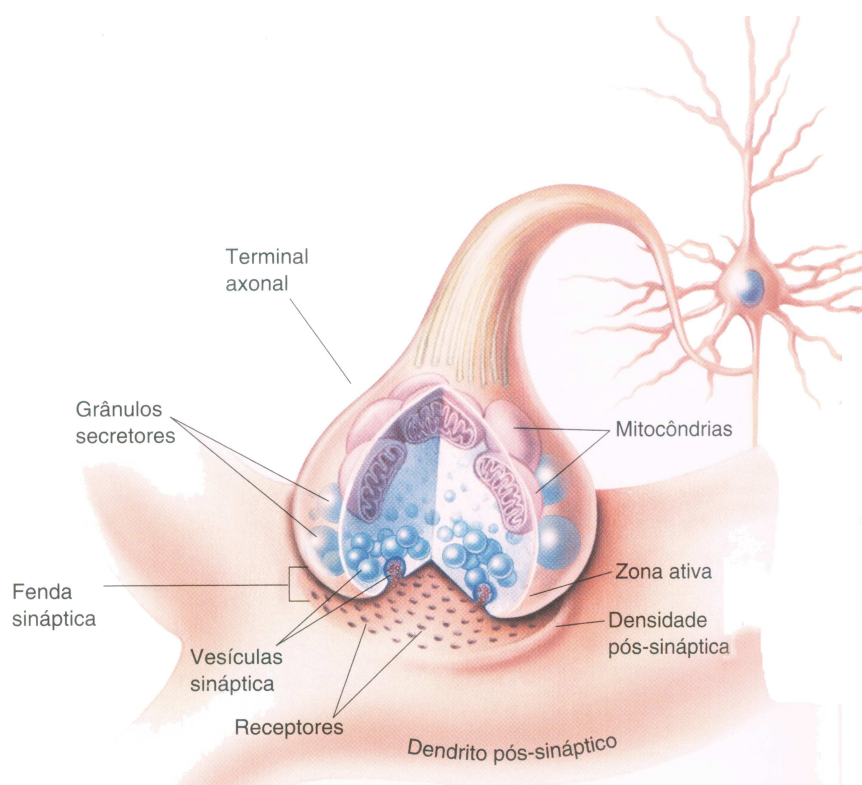
Com a chegada do potencial de ação no terminal axonal (Fig. 2.9), uma série de reações na célula pré-sináptica faz com que as vesículas se fundam com a membrana celular e liberem o seu conteúdo na fenda sináptica. Através da difusão, os neurotransmissores liberados na fenda sináptica alcançam a célula pós-sináptica onde existem os chamados receptores pós-sinápticos. Estes receptores são principalmente canais iônicos que modificam sua condutância de acordo com a presença de neurotransmissores, permitindo ou bloqueando a passagem de íons através da membrana (receptores ionotrópicos). Quando os receptores mudam a sua condutância ocorre uma alteração no fluxo de íons aos quais o canal iônico é permeável, causando uma modificação no potencial de membrana da célula pós-sináptica.

Existem receptores que liberam substâncias (segundos mensageiros) no interior da célula que por sua vez desencadearão outros processos internos, incluindo modificações nas propriedades de ativação dos receptores pós-sinápticos. Estes receptores são chamados metabotrópicos. Como poderíamos imaginar, as sinapses que utilizam segundos mensageiros para a sua ativação são mais lentas, e de uma complexidade ainda maior.

As sinapses podem ser inibitórias ou excitatórias, dependendo do efeito que produzem na célula pós-sináptica. Quando o canal iônico ativado pelo neurotransmissor leva o potencial de membrana para valores maiores (menores) que o potencial de repouso da célula, a sinapse é dita excitatória (inibitória). Analogamente, sinapses excitatórias provocam pulsos nas células pós-sinápticas chamados de potenciais excitatórios pós-sinápticos (PEPS), e as

sinapses inibitórias provocam potenciais inibitórios pós-sinápticos (PIPS).

As sinapses são fundamentais para as funções mais sofisticadas que os neurônios podem desempenhar. Existe um grande consenso de que mudanças nas condutâncias sinápticas decorrentes da própria atividade neural ou por substâncias moduladoras sejam as responsáveis por funções como memória, consciência, etc.



**Fig. 2.9: Sinapse química típica mostrando as principais estruturas que envolvem a comunicação sináptica. Retirado de Bear *et al.*, 2002.**

Em organismos vivos os neurônios são encontrados em grupos que estabelecem sinapses (químicas e elétricas) para desempenhar determinadas tarefas, que podem ser muito diferentes quanto à complexidade. Referimo-nos, ao longo deste trabalho, a pequenos grupos de neurônios encontrados em animais como redes neurais biológicas.

## **2.1. Neuromoduladores**

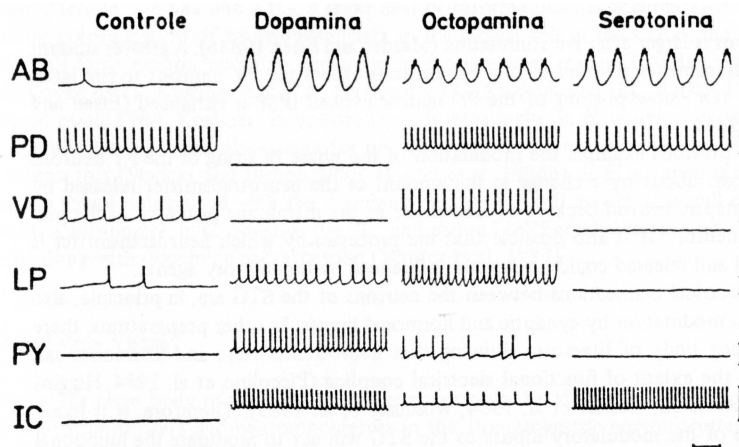
A maioria dos processos sinápticos envolve receptores ionotrópicos, ou seja, canais iônicos sensíveis aos neurotransmissores. No entanto, diversos receptores pós-sinápticos associados a proteínas G não estão associados a canais iônicos, ou seja, o receptor não participa diretamente do processo que gera os pulsos pós-sinápticos. Algumas destas substâncias atuam na própria efetividade da ação sináptica alterando a amplitude dos potenciais pós-sinápticos. Este efeito é chamado de modulação.

Substâncias moduladoras atuam de maneira muito mais lenta do que os neurotransmissores e podem provocar mudanças que duram minutos, horas ou dias. O estudo de neuromoduladores e seus efeitos em redes neurais é alvo de uma quantidade enorme de estudos correntes e acredita-se que se o entendimento do comportamento seja fundamental para o avanço do conhecimento e da descrição destas redes.

Os neuromoduladores podem provocar mudanças diferentes em sinapses mediadas por neurotransmissores diferentes. Em certas situações o efeito dos neuromoduladores pode ser comparado a um rearranjo das conexões sinápticas da rede. É fácil imaginar que a quantidade de modificações que uma única destas substâncias pode provocar seja enorme.

Somente para dar uma dimensão da complexidade do problema, o gânglio estomatogástrico dos crustáceos contém aproximadamente 30 neurônios. Chegam neste gânglio entre 100 e 250 fibras nervosas de outras partes do sistema nervoso, muitas delas trazendo substâncias moduladoras para o circuito (Selverston e Moulins, 1987), cada uma delas com um efeito diferente sobre a rede.

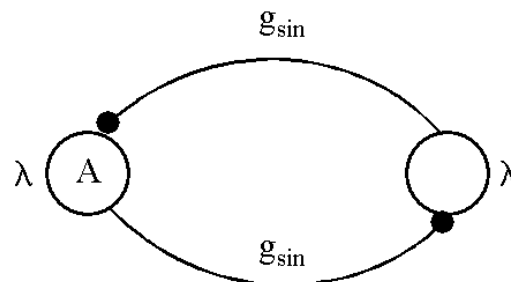
É sabido também que os neuromoduladores atuam também sobre a atividade intrínseca dos neurônios. A Fig. 2.8 mostra o efeito de alguns neuromoduladores na atividade individual de neurônios isolados do gânglio estomatogástrico dos crustáceos.



**Fig. 2.10: Efeito de diversos moduladores no comportamento dos neurônios isolados. Adaptado de Selverston e Moulins, 1987.**

## 2.2. Redes de inibição recíproca

Uma das redes neurais mais simples que produz algum comportamento coletivo é a chamada rede de inibição recíproca, formada por dois neurônios que possuem sinapses químicas inibitórias mútuas (Fig. 2.11).



**Fig. 2.11: Rede de inibição recíproca formada por dois neurônios acoplados por sinapses químicas inibitórias mútuas. Dois parâmetros podem controlar o comportamento da rede, um relacionado ao comportamento intrínseco dos neurônios e o outro que controla a intensidade com que os neurônios são acoplados.**



Em diversas redes, a inibição recíproca é observada entre antagonistas funcionais (Getting, 1989; Harris-Warrick and Marder, 1991; Marder and Calabrese, 1996). Em certos centros geradores de padrões, o período de oscilação do padrão motor é criticamente controlado por neurônios conectados por inibição recíproca (Arshavisky *et al.*, 1993; Calabrese and DeShutter, 1992; Marder and Calabrese, 1996).

As redes de inibição recíproca geram padrões de oscilação em que os neurônios disparam em oposição de fase, desde que a constante de decaimento sináptico seja menor do que o período de oscilação dos sinais pré-sinápticos (Friesen 1994; Marder and Calabrese 1996; Perkel and Mulloney 1974; Skinner *et al.* 1994; Wang and Rinzel 1992). No entanto, são observadas também oscilações em fase (Terman *et al.* 1998; van Vreeswijk *et al.* 1994; Wang and Rinzel 1992, 1993; White *et al.* 1998).

Neste trabalho, utilizamos constantes de decaimento sinápticas sempre muito menores do que os ciclos típicos de oscilação dos neurônios. Desta maneira, sempre que os neurônios conectados com inibição recíproca sincronizavam seus disparos, isto se dava em oposição de fase, o que concorda com as observações da literatura.

Nos moldes da teoria da sincronização, pode-se pensar que o problema de acoplar dois elementos idênticos é trivial. No entanto, dois pontos tornam a rede de inibição recíproca complexa. Primeiramente, o acoplamento dado pela sinapse química é essencialmente não-linear, o que traz uma dificuldade para a análise teórica. O outro é o fato da sinapse ser inibitória, ou seja, a corrente sináptica só é injetada quando o neurônio pré-sináptico está disparando e tende a levar o neurônio pós-sináptico a potenciais baixos, o que traz uma grande assimetria para o sistema.

Além disto, a influência da inibição e a resposta não-linear do neurônio trazem complexidades adicionais.

O ritmo final assumido por redes neurais em geral, o que inclui as redes de inibição recíproca, é determinado tanto pelo comportamento individual dos neurônios como também pelas conexões sinápticas (Marder, 1998; Skinner *et al.*, 1994). Conseqüentemente, modificações tanto da atividade elétrica intrínseca dos neurônios como da condutância sináptica produzem mudanças no padrão rítmico.

### 3. Sistemas dinâmicos

Tudo que tem um comportamento que evolui com o tempo pode ser considerado um sistema dinâmico. Assim, desde a evolução do número de bactérias que se reproduzem em uma cultura até a distribuição da temperatura do ar ao longo do planeta são sistemas dinâmicos.

Dentre esta classe de fenômenos alguns apresentam uma forma mais simples de evolução temporal, podendo ser modelados matematicamente através de equações diferenciais ordinárias acopladas. Nestes sistemas, algumas variáveis dinâmicas são suficientes para caracterizar o sistema e a dependência espacial pode ser ignorada.

A evolução temporal destes sistemas pode ser descrita:

$$\dot{X} = F(X) \quad (3.0)$$

onde  $X = (x_1, x_2, \dots, x_d)$  é o vetor das variáveis dinâmicas que descrevem completamente o estado do sistema,  $d$  é a dimensão do sistema, o ponto sobre a variável  $X$  representa a derivada temporal e  $F$  representa a função que determina a evolução do sistema.

Geralmente observamos o comportamento de sistemas dinâmicos em seu espaço de fases, que é o espaço  $d$ -dimensional onde cada uma das coordenadas representa uma variável dinâmica do sistema. Cada ponto neste espaço determina completamente o estado deste sistema, e conseqüentemente sua evolução temporal. Na Fig. 3.12b mostramos uma projeção bidimensional do espaço de fases de um sistema dinâmico tridimensional, o circuito de Matsumoto-Chua, cujas equações são dadas por:

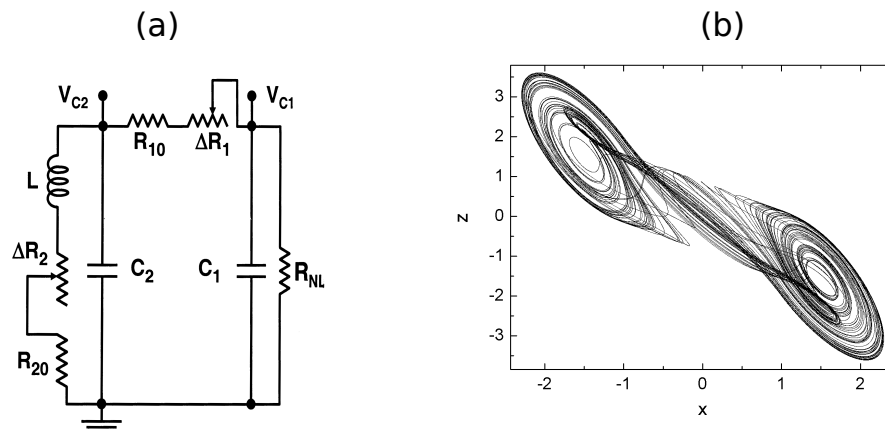
$$\frac{dx}{dt} = k\alpha (y - x - f(x))$$

$$\frac{dy}{dt} = k(x - y + z) \quad (3.0)$$

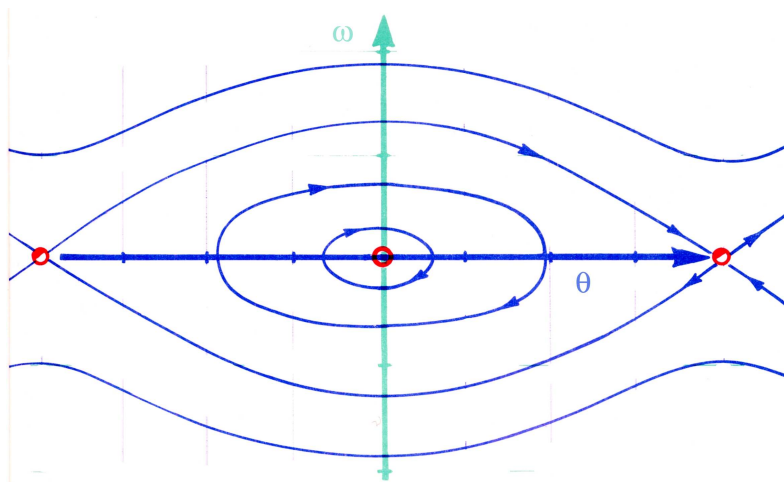
$$\frac{dz}{dt} = k\beta y$$

O retrato de fases também é utilizado na análise de sistemas dinâmicos, e consiste em uma representação que mostra os pontos fixos do sistema e todas as soluções (órbitas) possíveis do sistema dinâmico. A Fig. 3.13 mostra o retrato de fases para um pêndulo simples.

A complexidade da evolução temporal de um sistema dinâmico pode aumentar em função da sua dimensão. As soluções de sistemas com uma ou duas dimensões podem ser somente estados estacionários, quando o sistema tende para um ponto fixo, ou oscilações periódicas. Sistemas com três ou mais dimensões, entretanto, podem apresentar soluções bastante complexas e não periódicas, usualmente denominadas caóticas. Uma característica necessária para a existência de comportamento caótico é que  $F$  deve ser não-linear.



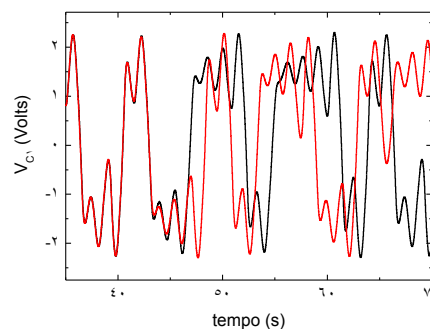
**Fig. 3.12:** (a) Circuito de Matsumoto-Chua composto por dois capacitores, um indutor, quatro resistores e um componente não-linear  $R_{NL}$ . As equações que descrevem as variáveis dinâmicas deste circuito podem ser reescaladas para apresentar a forma (Erro! Vínculo não válido.). (b) Atrator caótico obtido através da integração numérica das equações do circuito em uma projeção bidimensional do espaço de fases.



**Fig. 3.13:** Retrato de fases de um pêndulo simples. Na abscissa mostramos a variável  $\theta$  que é o ângulo do pêndulo com a vertical. Na ordenada mostramos a variável velocidade angular. As órbitas circulares representam o comportamento oscilatório do pêndulo e as linhas abertas representam o comportamento girante do pêndulo. As linhas curvas que conectam os pontos vermelhos são chamadas de separatrizes.

Uma característica dos sistemas caóticos é a divergência exponencial de órbitas inicialmente próximas, ou sensibilidade às condições iniciais. Órbitas de sistemas caóticos que partem de condições iniciais próximas (mas não idênticas) divergem

exponencialmente com o tempo. Isto tem implicações muito fortes na previsão de séries temporais, pois pequenas diferenças no conhecimento das condições iniciais do sistema levam a discrepâncias enormes entre o comportamento previsto e o observado (Fig. 3.14).

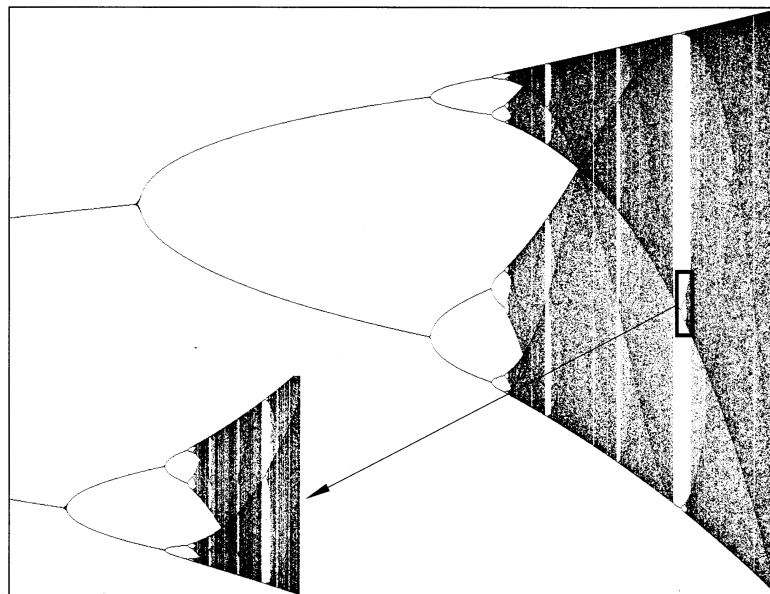
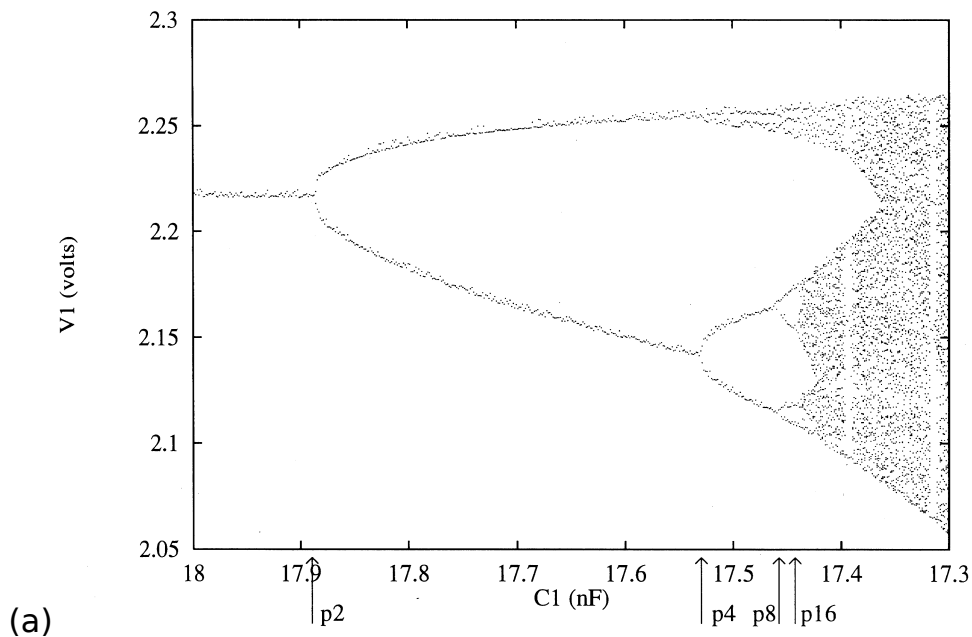


**Fig. 3.14: Sensibilidade às condições iniciais: a evolução de duas condições iniciais próximas divergem após algum tempo. A previsão do comportamento é possível somente para períodos curtos de tempo.**

O expoente de Lyapunov é uma medida da divergência entre órbitas estendida para  $d$  dimensões, onde  $d$  é a dimensão do sistema. Dado um ponto no espaço de fases, consideramos uma hipersfera de condições iniciais de raio infinitesimal e a sua evolução no tempo. Após um período  $\delta t$  a esfera é deformada assumindo a forma de uma elipse. A taxa média de crescimento (por unidade de tempo) do maior eixo da elipse é definida como o número de Lyapunov da órbita, e o seu logaritmo como o maior expoente de Lyapunov. Aos outros eixos ortogonais da elipse são atribuídos expoentes, e o conjunto deles forma o espectro de Lyapunov do sistema. Um expoente de Lyapunov positivo significa crescimento naquela direção e, conseqüentemente, divergência entre órbitas. Sistemas cujas órbitas ficam confinadas em um subespaço finito do espaço de fases e com pelo menos um expoente de Lyapunov positivo são considerados caóticos.

Muitas vezes estamos interessados em descrever como as órbitas que descrevem um sistema dinâmico se modificam em função de um parâmetro, observando por quais transições de comportamento (bifurcações) o sistema passa. Este tipo de problema é abordado pela teoria de bifurcações.

Em geral, as transições pelas quais um sistema dinâmico passa com a modificação de um parâmetro de controle acontecem de uma maneira estereotipada. Surpreendentemente, existe um número limitado e relativamente pequeno de maneiras com que um sistema dinâmico passa de um comportamento periódico para caótico. Estas bifurcações muitas vezes podem ser identificadas através do diagrama de bifurcações (Fig. 3.15), que mostra como a solução estacionária de um sistema dinâmico se modifica com o parâmetro de controle.

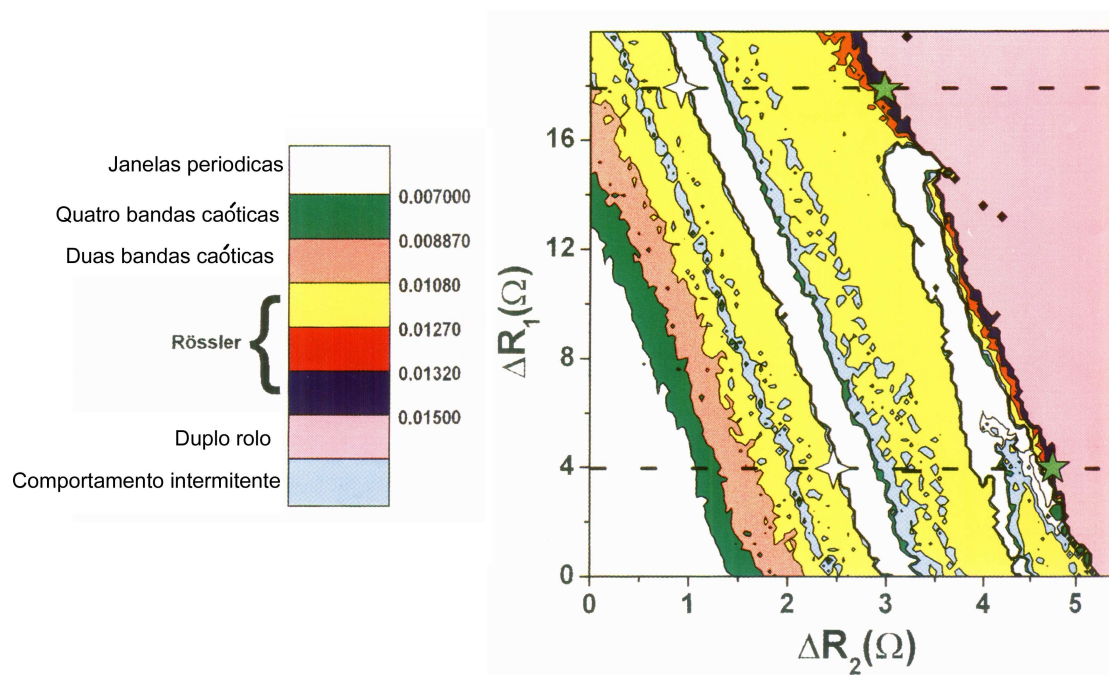


**Fig. 3.15: (a) Diagrama de bifurcações dos mínimos locais da variável dinâmica  $V_1$  do circuito de Matsumoto-Chua. A seqüência de bifurcações que o sistema passa (indicadas pelas setas) é observada em muitos sistemas diferentes, mostrando um exemplo de universalidade em sistemas dinâmicos. Retirado de Rabinder, 1993. (b) Diagrama de bifurcações do mapa logístico, mostrando as mesmas propriedades que as observadas para o circuito elétrico. O detalhe abaixo mostra que uma pequena região apresenta a mesma seqüência de bifurcações do diagrama inteiro, demonstrando a auto-similaridade destas estruturas.**

Podemos observar as modificações no comportamento de alguns sistemas dinâmicos em função de dois parâmetros de



controle. Nestes casos utilizamos os espaços de parâmetros onde os eixos representam cada um dos parâmetros variados e as cores dos pontos representam os diversos estados do sistema. Nestes gráficos, temos a possibilidade de observar como as diferentes combinações dos parâmetros podem produzir um comportamento específico ou uma transição particular (Fig. 3.16).



**Fig. 3.16: Exemplo de espaço de parâmetros para o circuito de Matsumoto-Chua construído experimentalmente em função de dois parâmetros do experimento. As cores identificam o tipo de comportamento que o sistema apresenta para cada conjunto de parâmetros. Adaptado de Baptista et al., 2003.**

### 3.1. Estabilidade estrutural

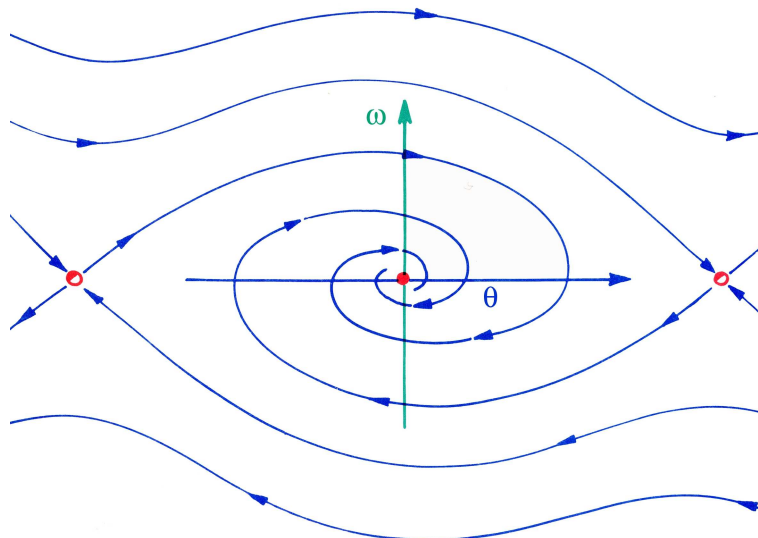
O comportamento de um sistema dinâmico pode ser geometricamente descrito através da construção do seu retrato de fases. Este tipo de gráfico proporciona um panorama do comportamento do sistema analisado. A Fig. 3.13 mostra o retrato de fases de um pêndulo simples dado pelas equações:

$$\begin{aligned}\dot{\theta} &= \omega \\ \dot{\omega} &= -\Omega^2 \sin(\theta) - \beta \omega\end{aligned}\quad (3.0)$$

Como podemos observar na Fig. 3.17, ao introduzirmos um termo dissipativo proporcional à velocidade angular na equação (Erro! Vínculo não válido.), temos:

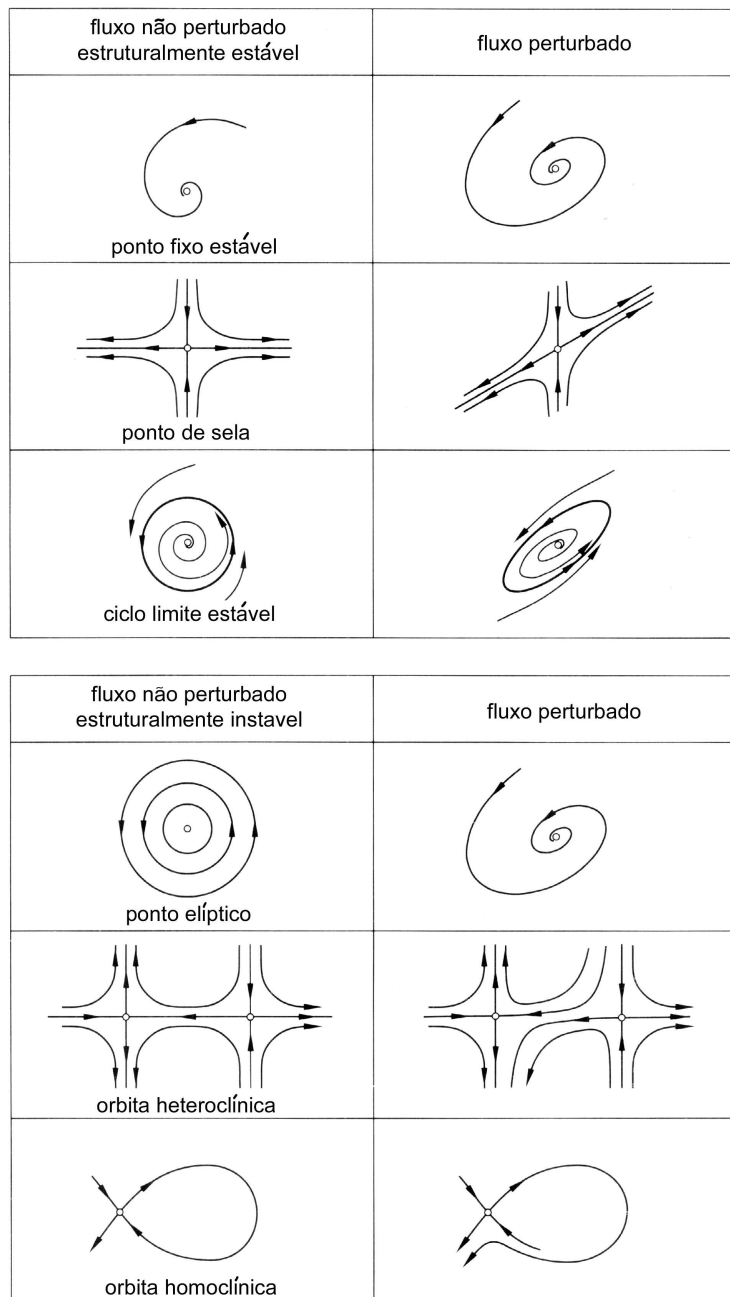
$$\begin{aligned}\dot{\theta} &= \omega \\ \dot{\omega} &= -\Omega^2 \sin(\theta) - \beta \omega\end{aligned}\quad (3.0)$$

Com o novo termo o retrato de fases é completamente modificado, conforme mostrado na Fig. 3.17. O elemento chave da estabilidade estrutural é que o retrato de fases da Fig. 3.13 só é observado quando a dissipação (dada pelo parâmetro  $\beta$ ) é nula. A transformação do retrato de fases acontece para perturbações infinitamente pequenas no parâmetro  $\beta$ . Este é o fator fundamental que exclui a possibilidade destes sistemas serem observados experimentalmente, já que nunca temos um controle completo dos parâmetros envolvidos em um experimento. Em  $\beta = 0$  o sistema não é estruturalmente estável.



**Fig. 3.17: Retrato de fases do pêndulo simples com atrito viscoso. Há uma grande modificação do espaço de fases para valores arbitrariamente pequenos do atrito.**

Em sistemas estruturalmente estáveis, o retrato de fases do sistema perturbado pode ser obtido como uma transformação contínua do espaço de fases não perturbado. Nestes casos, e também quando não há modificação do tipo, criação e nem destruição de pontos fixos, o sistema é estruturalmente estável (Fig. 3.18).



**Fig. 3.18: Exemplos de fluxos bidimensionais encontrados em retratos de fases e como são deformados por uma perturbação. Para os fluxos estáveis (quadro acima) a perturbação mantém a estrutura do retrato de fases topologicamente equivalente ao não perturbado, o que não acontece para os fluxos instáveis. Adaptado de Argyris *et al.* (1994).**

Na modelagem de sistemas dinâmicos, inevitavelmente, descrevemos situações idealizadas e aproximadas, desprezando ruídos, atritos, etc. No entanto, quando comparamos os resultados

dos modelos com resultados experimentais, temos a esperança de que o comportamento previsto tenha alguma semelhança com o observado experimentalmente. Em experimentos não temos como nos livrar das incertezas experimentais, do ruído, etc. e, portanto, o modelo deve ser robusto a perturbações. Esta robustez só existe quando o sistema é estruturalmente estável.

Ao longo deste trabalho nos referimos em certos momentos à estabilidade estrutural do comportamento caótico. Neste caso, rigorosamente falando, as órbitas do atrator caótico são instáveis, porém o comportamento caótico é robusto, desde que seja observado para uma faixa razoavelmente extensa de parâmetros (Rabinovich et al., 2005).

## **4. Modelos de atividade neural e de sinapses**

Diversos modelos de atividade neural foram propostos ao longo da evolução do conhecimento do funcionamento dos neurônios. Cada modelo apresenta níveis de sofisticação diferentes (Rabinovich *et al.*, 2005; Izhikevich, 2004; Kock, 1999). Modelos detalhados baseados em condutâncias da membrana levam em consideração especificidades das células e descrevem suas atividades através das correntes que fluem pelos canais iônicos contidos na membrana celular. Outros modelam o comportamento neural de forma fenomenológica, tentando identificar suas principais características sem necessariamente estabelecer correspondências entre os parâmetros dos modelos e medidas retiradas de experimentos.

Como sistemas que apresentam uma evolução temporal, os neurônios podem ser modelados através da maneira usual dos sistemas dinâmicos, ou seja, em termos de equações diferenciais ordinárias acopladas. Um destes modelos, chamado de modelo de compartimento único, tem o potencial de membrana descrito por uma única variável dinâmica, ou seja, somente a dependência temporal é levada em conta. Implicitamente é feita a hipótese de que o potencial de membrana permanece uniformemente distribuído ao longo da célula. Esta hipótese geralmente é válida para redes que têm uma conectividade simples, ou seja, as conexões que os neurônios fazem entre si não são extremamente numerosas e nem ocorrem em muitas regiões diferentes da

membrana do neurônio, como é o caso dos neurônios do gânglio estomatogástrico dos crustáceos (STG).

É claro que esta hipótese tem uma validade limitada. Em redes neurais mais complexas, as sinapses entre os neurônios seguem uma distribuição espacial complicada que tem sérias implicações na dinâmica da rede, principalmente devido à somação espacial, fenômeno no qual os diversos estímulos que chegam a um neurônio são somados ao longo da própria árvore dendrítica (Kandel *et al.*, 2003; Bear *et al.*, 2002). Nestes casos, claramente a hipótese de que os neurônios são isopotenciais não é mais válida. Mesmo no caso do STG, não são completamente claras quais são as implicações da utilização de modelos de compartimento único. Alguns dos resultados mostrados neste trabalho indicam que a simples modificação de um modelo de um para dois compartimentos permite ao modelo apresentar características mais compatíveis com as observadas experimentalmente.

### ***4.1.O modelo de Hodgkin e Huxley***

Alan Hodgkin e Andrew Huxley (HH) por volta de 1950 utilizaram a então recente invenção de um dispositivo de fixação de voltagem em experimentos com o axônio gigante da lula, e conseguiram revelar as bases do comportamento elétrico neural, explicando a produção de potenciais de ação sob um aspecto matemático formal, abrindo um vasto campo para a modelagem matemática de neurônios individuais e redes neurais.

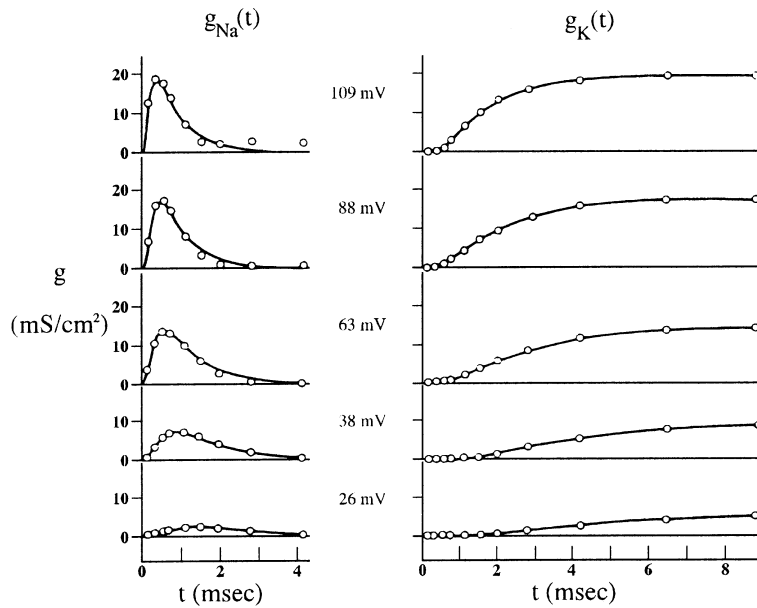
Os autores mostraram que a causa dos pulsos observados em medidas eletrofisiológicas era o fluxo de íons através da membrana celular e que o comportamento estereotipado destes pulsos estava relacionado a mecanismos ativos e seletivos presentes na

membrana celular que foram posteriormente identificados como canais iônicos.

Em experimentos onde as concentrações iônicas internas e externas do axônio foram manipuladas e bloqueadores específicos de canais iônicos, como tetrodotoxina (TTX) e tetraetilamônio (TEA) foram utilizados, HH chegaram à conclusão de que o potencial de ação era produzido por correntes de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e uma corrente de fuga. O experimento de fixação de voltagem permitiu observar a modificação das condutâncias destes íons em função do tempo, como mostrado na Fig. 4.19.

A parte mais genial do trabalho de HH foi a formulação da hipótese sobre a mudança da permeabilidade da membrana celular aos íons. Eles introduziram partículas fictícias de ativação e inativação dependentes de voltagem para descrever a dinâmica das condutâncias. Estas partículas podem assumir o estado aberto ou fechado, correspondendo a estados onde a membrana conduz ou não conduz corrente respectivamente, dependendo do tempo e do potencial de membrana. Eles postularam ainda que essas partículas passariam de um estado para outro de maneira independente umas das outras. Todas as propriedades cinéticas do modelo estão contidas nestas variáveis de ativação e inativação.





**Fig. 4.19: Resultados experimentais de Hodgkin e Huxley para as condutâncias efetivas da membrana do axônio gigante da lula para o íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ . Estes dados juntamente com as hipóteses feitas por eles deram origem ao primeiro modelo quantitativo para a dinâmica neural.**

O modelo proposto por HH para a corrente de  $\text{K}^+$  é dado por:

$$I_K = \bar{G}_K n^4 (V - E_K), \quad (4.1)$$

onde  $I_K$  é a corrente de íons que flui pela membrana por unidade de área,  $\bar{G}_K$  é a condutância máxima da membrana ao  $\text{K}^+$  por unidade de área,  $E_K$  é o potencial reverso para o  $\text{K}^+$  e o fator  $n$ , que pertence ao intervalo  $[0;1]$ , corresponde à probabilidade de encontrar uma partícula no estado aberto.

Assim, o esquema cinético proposto pelos autores assume que as partículas passam de um estado para outro com probabilidades dependentes do potencial de membrana, de acordo com o seguinte esquema:

$$n \xrightleftharpoons[\beta_n]{\alpha_n} n+1,$$

onde  $\alpha_n$  e  $\beta_n$  são as probabilidades de transição de um estado para outro e  $n$  é a fração do número total de partículas que está no

estado ativo. Utilizando o esquema cinético, a equação que descreve a evolução temporal de  $n$  é:

$$\frac{dn}{dt} = \alpha_n(V)(1-n) - \beta_n(V)n. \quad (4.2)$$

Com estas hipóteses, e um ajuste aos dados experimentais, foi possível encontrar expressões para  $\alpha_n$  e  $\beta_n$ .

Como a corrente de  $\text{Na}^+$  se desativa espontaneamente, os autores tiveram que formular uma hipótese extra para modelar este comportamento. Eles imaginaram que além das partículas de ativação, deveria haver também partículas de inativação, as quais fariam com que a membrana deixasse de conduzir corrente.

Assim, a corrente de  $\text{Na}^+$  seria dada por:

$$I_{\text{Na}} = G_{\text{Na}}^- m^r h (V - E_{\text{Na}}),$$

onde  $m$  e  $h$  determinam os estados das variáveis de ativação e inativação para o  $\text{Na}^+$  e os demais parâmetros são análogos ao caso da corrente de  $\text{K}^+$ .

Neste caso o esquema cinético se aplica às duas partículas, dando origem ao comportamento temporal:

$$\frac{dm}{dt} = \alpha_m(V)(1-m) - \beta_m(V)m,$$

$$\frac{dh}{dt} = \alpha_h(V)(1-h) - \beta_h(V)h.$$

Este modelo ajustado às curvas experimentais mostradas na Fig. 4.19 descreveu pela primeira vez a dinâmica do potencial de ação de forma quantitativa.

As taxas de ativação e inativação obtidas por HH foram:

$$\alpha_n(V) = \frac{1 \cdot -V}{1 \cdot \cdot \left( e^{\frac{1 \cdot -V}{80}} - 1 \right)},$$

$$\beta_n(V) = 0.125 e^{\frac{-V}{80}},$$

$$\alpha_m(V) = \frac{v_\infty - V}{1 + e^{\frac{v_\infty - V}{\lambda}}},$$

$$\beta_m(V) = \xi e^{\frac{-V}{\lambda}},$$

$$\alpha_h(V) = 0.07 e^{\frac{-V}{20}}$$

$$\beta_h(V) = \frac{1}{e^{\frac{30-V}{10}} + 1}.$$

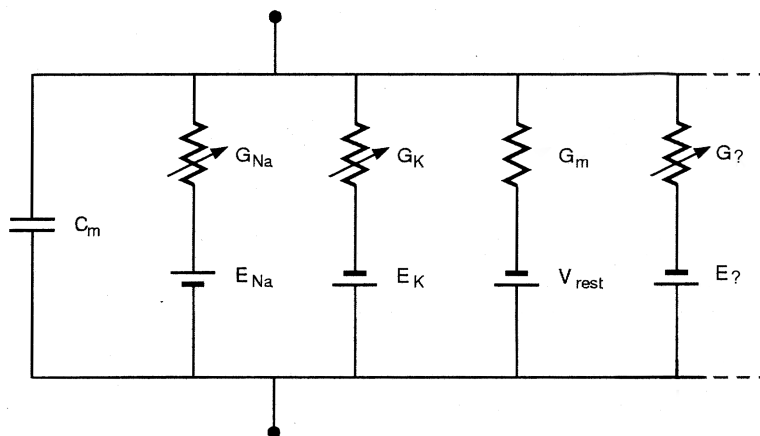
## **4.2. Modelos gerais baseados no formalismo de Hodgking-Huxley**

Uma das grandes contribuições deixadas por Hodgkin e Huxley foi a descoberta do mecanismo pelo qual os neurônios produzem sua atividade elétrica: a permeabilidade seletiva e dependente da voltagem da membrana celular. Apesar de não terem recursos experimentais suficientes para inferir que este comportamento estava ligado à presença de canais iônicos, o trabalho original forneceu indícios até mesmo sobre o comportamento e a estrutura destes elementos. Quase 40 anos antes do estabelecimento das modernas técnicas de biologia molecular, os expoentes obtidos do ajuste das curvas de ativação aos dados experimentais (4 para o potássio e 3 para o sódio), indicavam o número de estruturas idênticas que hoje se sabem formar as proteínas chamadas de canais iônicos.

O trabalho de HH com a membrana axonal forneceu também um método sistemático utilizar informações de dados experimentais para construir modelos matemáticos mais completos para o funcionamento do neurônio. As características dinâmicas das condutâncias para um novo íon podem ser inferidas a partir dos

experimentos de fixação de voltagem e a corrente devido ao novo íon pode ser facilmente incluída no modelo.

O esquema da Fig. 4.20 mostra a idéia dos modelos gerais baseados no formalismo de HH, onde o circuito elétrico é sempre bastante similar, e cada íon corresponde a um ramo no circuito. O comportamento cinético da membrana com respeito a este íon fica inteiramente contido na dependência da sua condutância em função do potencial de membrana.



**Fig. 4.20: Circuito elétrico equivalente à membrana neural. Acrescentar o comportamento de algum íon no modelo equivale a acrescentar um ramo no circuito, com uma bateria que equivale ao potencial reverso do íon e um resistor que representa a condutância da membrana àquele íon em função do potencial de membrana.**

Em alguns casos, como para correntes de cálcio, por exemplo, a concentração do íon pode variar significativamente no interior da célula, devido a estruturas celulares que funcionam como acumuladores. Nestes casos, é incluída também a variação do potencial de Nernst para o íon, pois com a mudança da concentração interna o potencial químico que impulsiona os íons é alterado. No modelo isto corresponde à bateria associada àquele íon ter uma dependência da concentração interna do íon.

Em outros casos a condutância da membrana a um íon pode depender da concentração de outro íon, como é o caso da corrente de potássio dependente de cálcio,  $I_{KCa}$ . Neste caso, a condutância de

potássio tem termos dependentes de voltagem e da concentração interna de cálcio.

Embora possam envolver mecanismos bem mais sofisticados dos concebidos originalmente, os modelos que descrevem a membrana como o circuito elétrico da Fig. 4.20 e as condutâncias em termos de variáveis de ativação e inativação, são usualmente chamados de modelos baseados no formalismo de Hodgkin e Huxley.

### **4.3.O modelo HH1C**

Um dos modelos mais detalhados para neurônios do gânglio estomogástrico dos crustáceos encontrados atualmente na literatura é o proposto por Prinz *et al.* (2003). Este modelo se baseia em condutâncias do tipo Hodgkin e Huxley e leva em consideração uma quantidade bastante significativa de tipos diferentes de condutâncias.

Originalmente o modelo vem de medidas feitas por Turrigiano *et al.* (1995). Posteriormente foi modificado por Liu *et al.* (1998) e finalmente, Prinz *et al.* (2003) introduziram uma corrente ativada por hiperpolarização  $I_H$  retirada de (Huguenard e McCormick, 1992).

O modelo consiste em um único compartimento com oito condutâncias do tipo Hodgkin-Huxley e um reservatório de cálcio. As correntes iônicas são: uma corrente rápida de sódio ( $Na^+$ ), uma corrente rápida e outra lenta de cálcio ( $Ca_T$  e  $Ca_S$ ), uma corrente rápida de potássio ( $A$ ), uma corrente de potássio dependente de cálcio ( $KCa$ ), uma corrente retificadora de potássio ( $Kd$ ), uma corrente ativada por hiperpolarização ( $H$ ) e uma corrente de fuga (leak).

Cada uma das correntes é descrita por

$$I_i = \bar{g}_i m_i^\gamma h_i^\delta (V - E_i) A_r,$$

onde  $\bar{g}_i$  é a condutância máxima por unidade de área,  $E_i$  é o potencial reverso,  $A_r = 0.628 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$  é a área da membrana do neurônio. A menos que seja mencionado, os valores das condutâncias individuais são (em  $\text{mS/cm}^2$ ):  $\bar{g}_{Na} = 200$ ,  $\bar{g}_{CaT} = 2.5$ ,  $\bar{g}_{CaS} = 4$ ,  $\bar{g}_A = 50$ ,  $\bar{g}_{KCa} = 5$ ,  $\bar{g}_{Kd} = 100$ ,  $\bar{g}_H = 0.01$  e  $\bar{g}_{leak} = 0.01$ . Para estes parâmetros o modelo apresenta comportamento em rajadas. Os potenciais de Nernst para os íons são (em mV): 50 para o  $\text{Na}^+$ , -80 para as três correntes de potássio, -20 para  $I_H$ , e -50 para  $I_{leak}$ . O potencial de Nernst para o cálcio é determinado pela concentração de cálcio instantânea e uma concentração extracelular de 3 mM através da equação de Nernst. O valor dos expoentes inteiros  $\gamma$  e  $\delta$  são dados na Tabela 2. A dependência das variáveis de ativação com o tempo é dada por :

$$\tau_m \frac{dm}{dt} = m_\infty - m \quad \text{e} \quad \tau_h \frac{dh}{dt} = h_\infty - h,$$

onde  $\tau_m$  e  $\tau_h$  são constantes de decaimento e  $h_\infty$  e  $\tau_\infty$  os valores assintóticos de  $h$  e  $\tau$ , respectivamente, e estão listados na Tabela 2.

O potencial de membrana é dado por:

$$C \frac{dV}{dt} = \sum_i I_i$$

onde  $C = 0.628 \text{ nF}$  é a capacitância da célula e a dinâmica da concentração intracelular de cálcio é dada por:

$$\tau_{Ca} \frac{d[Ca^{+2}]}{dt} = -f(I_{CaT} + I_{CaS}) - [Ca^{+2}] + [Ca^{+2}]_0,$$

onde  $\tau_{Ca} = 200 \text{ ms}$  é a constante de tempo de remoção,  $f = 14.96 \mu \text{ M/nA}$  e  $[Ca^{+2}]_0$  é a concentração intracelular de cálcio para a qual não há fluxo deste íon através da membrana.

	$\gamma_i$	$\delta_i$	$m_\infty$	$h_\infty$	$\tau_m$	$\tau_h$
$I_{Na}$	3	1	$\frac{1}{1+e^{\left(\frac{V+25.5}{5.29}\right)}}$	$\frac{1}{1+e^{\left(\frac{V+48.9}{5.18}\right)}}$	$2.64 - \frac{2.52}{1+e^{\left(\frac{V+120}{25}\right)}}$	$\frac{1.34}{1+e^{\left(\frac{V+62.9}{10}\right)}} * \left(1.5 + \frac{1}{1+e^{\left(\frac{V+34.9}{3.6}\right)}}\right)$
$I_{CaT}$	3	1	$\frac{1}{1+e^{\left(\frac{V+27.1}{-7.2}\right)}}$	$\frac{1}{1+e^{\left(\frac{V+32.1}{5.5}\right)}}$	$43.4 - \frac{42.6}{1+e^{\left(\frac{V+68.1}{-20.5}\right)}}$	$210 - \frac{179.6}{1+e^{\left(\frac{V+55}{-16.9}\right)}}$
$I_{CaS}$	3	1	$\frac{1}{1+e^{\left(\frac{V+33}{-8.1}\right)}}$	$\frac{1}{1+e^{\left(\frac{V+60}{6.2}\right)}}$	$2.8 + \frac{14}{e^{\left(\frac{V+27}{10}\right)} + e^{\left(\frac{V+70}{-13}\right)}}$	$120 + \frac{300}{e^{\left(\frac{V+55}{9}\right)} + e^{\left(\frac{V+65}{-16}\right)}}$
$I_A$	3	1	$\frac{1}{1+e^{\left(\frac{V+27.2}{-8.7}\right)}}$	$\frac{1}{1+e^{\left(\frac{V+56.9}{4.9}\right)}}$	$23.2 - \frac{20.8}{1+e^{\left(\frac{V+32.9}{-15.2}\right)}}$	$77.2 - \frac{58.4}{1+e^{\left(\frac{V+38.9}{-26.5}\right)}}$
$I_{K(Ca)}$	4	0	$\frac{[Ca]}{[Ca]+3} * \frac{1}{1+e^{\left(\frac{V+28.3}{-12.6}\right)}}$		$180.6 - \frac{150.2}{1+e^{\left(\frac{V+46}{-22.7}\right)}}$	
$I_{Kd}$	4	0	$\frac{1}{1+e^{\left(\frac{V+12.3}{-11.8}\right)}}$		$14.4 - \frac{12.8}{1+e^{\left(\frac{V+28.3}{-19.2}\right)}}$	
$I_H$	1	0	$\frac{1}{1+e^{\left(\frac{V+75}{5.5}\right)}}$		$\frac{2}{e^{\left(\frac{V+169.7}{11.6}\right)} + e^{\left(\frac{V-26.7}{14.3}\right)}}$	

**Tabela 2: Variáveis dependentes de voltagem do modelo.**

### 4.4.O modelo de Hindmarsh e Rose

O modelo inicial proposto por Hindmarsh e Rose (1992) foi concebido com bases em dois tipos de medidas eletrofisiológicas. Os autores consideraram medidas de fixação de voltagem e transientes após a aplicação de degraus de corrente em células do gânglio visceral do molusco *Lymnaea stagnalis*. Estes dois tipos de medidas propiciaram um ajuste do tipo polinomial e a elaboração de um modelo bidimensional que apresenta potenciais de ação similares aos de neurônios reais.

Inicialmente, os autores consideraram que a variação do potencial de membrana  $x$  do neurônio dependesse linearmente tanto de uma corrente intrínseca  $y$  como da corrente  $z$  que passa pelo eletrodo (corrente externa). Supuseram também que a variação de  $x$  depende de uma forma não-linear do próprio potencial de membrana, de acordo com uma função  $f(x)$ . Assim, a variação de  $x$  com o tempo pode ser escrita como:

$$\dot{x} = -a(f(x) - y - z) \quad (4.0)$$

A dinâmica da corrente intrínseca foi modelada de acordo com a observação experimental de que a corrente necessária para fixar a voltagem apresenta uma saturação exponencial logo após um pulso de tensão. Assim, sua variação deve depender linearmente da própria corrente. Supuseram que esta corrente depende de uma forma não-linear do potencial de membrana, dada pela função  $g(x)$ . Assim, chegaram à seguinte equação:

$$\dot{y} = b(g(x) - y) \quad (4.0)$$

A simplificação introduzida está em assumir que  $y(t)$  tem um tempo de decaimento constante após o pulso de voltagem, ou seja, varia exponencialmente. Isto difere das hipóteses feitas por Hodgkin e Huxley que levaram em conta mudanças no tempo de decaimento, contidas nas variáveis  $\alpha(V)$  e  $\beta(V)$ .

Ao aplicar um degrau de tensão, fixando o potencial da célula em um valor  $x_p$ , temos;

$$\dot{x} = 0 = -a(f(x) - y - z)$$

e portanto,

$$z_{x_p} = -f(x_p) - y$$

é a corrente necessária para manter o potencial de membrana fixo em  $x_p$ . Já a corrente intrínseca  $y$  tem sua evolução temporal descrita por:

$$\dot{y} = b(g(x_p) - y),$$

que pode ser resolvida para a condição inicial de  $y(0)=0$ , resultando em

$$y(t) = g(x_p)(1 - e^{-bt}).$$

Assim,

$$z(x_p)(t) = f(x_p) - g(x_p)(1 - e^{-bt})$$

e conseqüentemente



$$\begin{aligned} z_{x_p}(0) &= f(x_p) \\ z_{x_p}(\infty) &= f(x_p) - g(x_p) \end{aligned} \quad \cdot$$

Para obter  $f(x)$  e  $g(x)$ , os valores das correntes iniciais  $z_{x_p}(\cdot)$  foram ajustados a uma equação cúbica e  $z_{x_p}(\infty)$  a uma exponencial.

Assim, a forma final assumida pelo modelo é dada por:

$$\begin{aligned} \dot{x} &= -a(f(x) - y - z) \\ \dot{y} &= b(f(x) - qe^{rx} + s - y) \end{aligned}$$

onde  $f(x) = cx^3 + dx^2 + ex + h$  e todos os coeficientes são constantes.

Com estas equações Hindmarsh e Rose foram capazes de reproduzir os potenciais de ação e a variação da taxa de disparo do neurônio em função da corrente injetada no neurônio.

Os mesmos autores posteriormente estenderam o modelo para um sistema de três equações diferenciais (Hindmarsh e Rose, 1984). Uma nova variável dinâmica foi incluída, fazendo com que o modelo reproduzisse propriedades mais complexas, como disparar potenciais de ação em rajadas.

O modelo completo tridimensional proposto pelos autores tem a seguinte forma:

$$\begin{aligned} \dot{x} &= y - ax^3 + bx^2 + I - z \\ \dot{y} &= c - dx^2 - y \\ \dot{z} &= r(s(x - x_1) - z) \end{aligned}$$

Uma quarta equação foi introduzida por Pinto *et al.* (2000) para incluir no modelo uma dinâmica ainda mais lenta que a de  $z$ , que poderia ser relacionada com a troca de cálcio com reservatórios intracelulares, por exemplo. Esta modificação proporcionou ao modelo a possibilidade de realizar hiperpolarizações um pouco mais longas que o modelo tridimensional, o que se aproxima melhor do observado nos neurônios do STG. Além disto, os autores afirmam que a faixa de parâmetros em que o modelo apresenta comportamento caótico é maior, o que também é mais próximo dos

dados experimentais, já que diversos neurônios do STG apresentam comportamento caótico estruturalmente estável quando isolados do circuito. Para maiores detalhes veja seção 5.1.1.

### 4.5. Modelo de conexão sináptica

Em nossas simulações utilizamos um modelo de conexão sináptica adotado por diversos autores (Destexhe et al., 1994; Abbott and Marder, 1998; Nadim et al., 1999; Sharp et al., 1993). Este modelo tenta descrever a dinâmica envolvida na liberação, difusão e captação de neurotransmissores pelos receptores pós-sinápticos. A corrente sináptica é dada por:

$$I_{sin} = g_{sin} S(t) (V_{rev} - V_{pos}(t)) , \quad (4.0)$$

onde  $g_{sin}$  é a condutância sináptica máxima,  $V_{rev}$  é o potencial de reversão sináptico,  $V_{pos}$  é o potencial de membrana pós-sináptico e  $S(t)$  é a variável dinâmica de ativação sináptica, definida pela equação:

$$(1 - S_{\infty}(V_{pre})) \tau_s \frac{dS(t)}{dt} = (S_{\infty}(V_{pre}) - S(t)) , \quad (4.0)$$

onde  $V_{pre}$  é o potencial de membrana pre-sináptico,  $\tau_s$  é a constante de decaimento sináptico e

$$\begin{cases} S_{\infty}(V_{pre}) = \tanh\left(\frac{V_{pre}(t) - V_{thres}}{V_{slope}}\right), & V_{pre} > V_{pos} \\ S_{\infty}(V_{pre}) = 0, & V_{pre} < V_{pos} \end{cases} . \quad (4.0)$$

A dinâmica associada ao neurotransmissor e seus efeitos sobre a célula pós-sináptica estão contidos em  $S(t)$ , variável que assume valores no intervalo  $[0;1]$  e determina qual é a parcela da condutância máxima que está ativa em função do tempo.

Com a chegada do potencial de ação ao terminal sináptico, o potencial de membrana cresce, ultrapassando o limiar de liberação

de neurotransmissores  $V_{thres}$ . Quando isto acontece, a variável  $S_\infty$  cresce rapidamente. A equação (Erro! Vínculo não válido.) mostra que a função  $S(t)$  tende à  $S_\infty$  com constante de tempo efetiva

$$\tau_{ef} = (1 - S_\infty(V_{pre})) \tau_s .$$

Isto significa que quando  $S_\infty$  tende a 1, a constante de tempo efetiva vai a zero, e  $S$  tende a  $S_\infty$  praticamente instantaneamente. Com o término do potencial de ação, o potencial de membrana decresce novamente e conseqüentemente  $S_\infty$  vai a zero novamente. Então  $S$  tende a zero porém com constante de decaimento efetiva  $\tau_{ef} = \tau_s$ . Assim, a constante de decaimento sináptico  $\tau_s$  determina como a condutância sináptica decresce após o potencial de ação alcançar o terminal sináptico.

A constante  $V_{slope}$  determina quão rápido a função  $S_\infty$  cresce com o potencial de membrana. A constante  $V_{thres}$ , conforme já foi citado, determina qual é o potencial de membrana no qual a célula pré-sináptica inicia a liberação de neurotransmissores na fenda sináptica. Através de  $V_{thres}$ , podemos simular redes neurais que contêm sinapses graduais (*graded*), encontradas em neurônios do gânglio estomatogástrico dos crustáceos. Nestas sinapses, o início da transmissão sináptica ocorre para potenciais abaixo do limiar de disparo do potencial de ação, o que significa que existe liberação de neurotransmissores sem que haja necessariamente um potencial de ação.

## 5. Metodologia

### 5.1. Métodos Numéricos

#### 5.1.1. Modelo SN (axônio + $I_H$ )

Alguns CPGs são capazes de produzir ritmos sem que nenhum dos neurônios constituintes sejam disparadores endógenos, como por exemplo o CPG gástrico dos crustáceos (Selverston *et al.*, 1976). Nestes casos, o rebote pós-inibitório tem um papel fundamental. Este comportamento é uma característica da excitabilidade neural e já está contido no modelo original de HH para o axônio gigante da lula (Hodgkin e Huxley, 1952).

Desenvolvemos um modelo bastante simplificado de neurônio que apresenta rebotes pós-inibitórios. Como ponto de partida utilizamos as condutâncias para as correntes de fuga, sódio e potássio (retificadora) do modelo de Prinz *et al.* (2003) e a corrente responsável pelo rebote foi elaborada conforme descrito a seguir.

Em nosso modelo as correntes iônicas são obtidas através do formalismo usual de condutâncias do tipo Hodgkin-Huxley:

$$I_i = g_i m_i^\alpha h_i^\beta (V - E_i) ,$$

onde onde  $i = Na, K, H$  e fuga. As variáveis de ativação e inativação são dadas por

$$\tau_i^m \frac{dm_i}{dt} = m_i^\infty - m_i ,$$

$$\tau_i^h \frac{dh_i}{dt} = h_i^\infty - h_i .$$

onde

$$m_{Na}^{\infty} = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{V + 25.5}{-5.29}\right)},$$

$$m_K^{\infty} = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{V + 12.3}{-11.8}\right)},$$

$$m_H^{\infty} = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{V + 10}{Slope_H^m}\right)},$$

$$h_{Na}^{\infty} = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{V + 48.9}{5.18}\right)},$$

$$\tau_{Na}^m = 2.64 - 2.52 \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{V + 120}{-25}\right)},$$

$$\tau_K^m = 14.4 - 12.8 \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{V + 28.3}{-19.2}\right)},$$

$$\tau_H^m = \frac{50}{\left(1 + \exp\left(\frac{V + 80}{-2}\right)\right) \left(\exp\left(\frac{V + 169.7}{-21.6}\right) + \exp\left(\frac{V - 26.7}{20.3}\right)\right)},$$

$$\tau_{Na}^h = \frac{1.34}{1 + \exp\left(\frac{V + 62.9}{-10}\right)} \left(1.5 + \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{V + 34.9}{3.6}\right)}\right).$$

A variável  $Slope_H^m$  é um parâmetro de controle que muda as propriedades dos disparos do neurônio após a inibição. O potencial de membrana é calculado através das somas das correntes

$$AC \frac{dV}{dt} = \sum_i I_i,$$

onde A é a área da célula, C é a capacitância da célula e  $i$  representa os diversos tipos de correntes.

Os parâmetros utilizados foram  $C = 0.628$  nF,  $A = 0.628 \times 10^{-3}$  cm<sup>2</sup>;  $E_{Na} = 50.0$  mV,  $E_K = -80.0$  mV,  $E_H = -20.0$  mV,  $E_{fuga} = -50.0$  mV;

$g_{Na} = 200.0 \text{ mS/cm}^2$ ,  $g_{Kd} = 125.0 \text{ mS/cm}^2$ ,  $g_H = 5.12 \text{ mS/cm}^2$ ,  $g_{fuga} = 0.04 \text{ mS/cm}^2$ ,  $\text{Slope}_m^H = 1.925$ . Para as correntes de Na,  $\alpha = 3$  e  $\beta = 1$ ; K,  $\alpha = 4$  e  $\beta = 0$ ; H,  $\alpha = 1$  e  $\beta = 0$ ; leak  $\alpha = \beta = 0$ .

As variáveis dinâmicas  $m^H_{inf}$  e  $\tau^H_m$  que determinam o comportamento da corrente de hiperpolarização em função do potencial de membrana são mostradas na Fig. 5.21. Podemos observar que a ativação da corrente, dada pela variável  $m^H_{inf}$  (em azul), só ocorre para valores abaixo de  $-70\text{mV}$ . No entanto, em torno deste mesmo valor do potencial de membrana, o valor do tempo de decaimento é bastante grande, em torno de  $2500 \text{ ms}$ . Com isto, quando o neurônio retorna de uma inibição forte, a ativação cai lentamente, fazendo com que o neurônio permaneça disparando mais fortemente por algum tempo.

**Fig. 5.21: Funções  $m^H_{inf}$  (em azul, escala à esquerda) e  $\tau^H_m$  (em preto, escala à direita) que determinam a função de ativação da corrente de hiperpolarização em função do potencial de membrana para o modelo SN. As linhas tracejadas mostram o efeito de alterações no parâmetro  $\text{Slope}_m^H$ .**

### 5.1.2. Modelo HR

Utilizamos a versão quadridimensional do modelo HR que é dada por:

$$\dot{x} = Ay - Cx^3 + Bx^2 - Dz + I$$

$$\dot{y} = E - Fx^2 - y - Gw$$

$$\dot{z} = \mu (S(x+H) - z)$$

$$\dot{w} = \eta (R(y+L) - Kw)$$

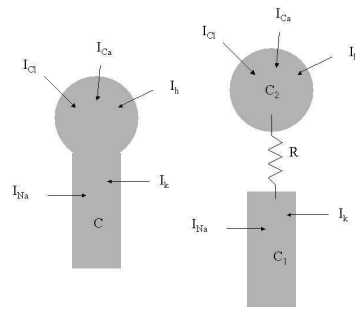
onde,  $A = 1$ ,  $B = 3$ ,  $C = 1$ ,  $D = 0.99$ ,  $E = 1.01$ ,  $F = 5.0128$ ,  $G = 0.0278$ ,  $H = 1.605$ ,  $K = 0.9573$ ,  $L = 1.619$ ,  $\mu = 0.0021$ ,  $\nu = 0.0009$ ,  $R = 3$ ,  $S = 3.966$ .

O parâmetro  $I$  foi variado para controlar o comportamento do modelo.

### **5.1.3. Modelo HH2C**

Modificamos o modelo de Prinz *et al.* (2003) (HH1C) de forma que ele representasse melhor o comportamento elétrico observado em neurônios isolados do STG. Uma das deficiências do modelo HH1C é que o potencial de membrana nunca apresenta hiperpolarizações. Isto prejudica a análise do comportamento destes modelos em redes, pois não é possível incluir, por exemplo, a dinâmica de sinapses graduais observadas no STG. O processo que utilizamos para incluir as características desejadas no modelo foi redistribuir as correntes iônicas do modelo em dois compartimentos.

Um dos compartimentos representa a atividade do soma e o outro a atividade do axônio, que basicamente contém as correntes que geram os potenciais de ação. Os dois compartimentos têm atividades independentes, em princípio, e estão acoplados eletricamente. O potencial de membrana de cada um é calculado nos moldes usuais do formalismo de modelos de Hodgkin-Huxley. Foi considerada também uma diferença no tamanho dos compartimentos (Fig. 5.22).



**Fig. 5.22: Ilustração do processo utilizado na elaboração do modelo de dois compartimentos para a atividade neural. O modelo no qual nos baseamos (esquerda) consistia de um único compartimento, no qual todas as correntes contribuíam para o potencial de membrana. No nosso modelo (direita), cada compartimento contém diferentes tipos de correntes e são conectados através de uma resistência elétrica passiva que permite difusão de íons entre os compartimentos.**

A separação em dois compartimentos faz com que uma característica importante seja incorporada ao modelo, a presença de hiperpolarizações. Do ponto de vista funcional, as hiperpolarizações não possuem um papel muito claro, a não ser o fato do neurônio não disparar potenciais de ação (Selverston e Moulins, 1987). No entanto, no caso do gânglio estomatogástrico as sinapses têm a característica de serem graduais, o que significa que o nível de disparo para a liberação de neurotransmissor está apenas um pouco acima do seu potencial de repouso e há liberação de neurotransmissores mesmo sem o disparo de um potencial de ação. Acredita-se que este tipo de sinapse tem um efeito importante na determinação do padrão gerado pelas redes neurais (Selverston e Moulins, 1987).

Assim, ao incorporarmos as hiperpolarizações ao modelo, automaticamente podemos introduzir as sinapses graduais nas simulações de redes neurais, simplesmente ajustando a variável sináptica  $V_{thres}$  abaixo do limiar de disparo dos potenciais de ação.

A maior parte dos parâmetros foram usados tal qual no modelo HH1C (Prinz *et al.*, 2003), com poucas exceções, descritas a seguir.



A equação que determina o potencial de membrana foi desmembrada em duas, uma para o potencial do soma e a outra para o axônio. Isto aumentou uma dimensão no modelo, que passou a ter 14 equações diferenciais acopladas.

$$C \frac{dV}{dt} = -(-I_{\text{sin}} + I_{\text{CaT}} + I_{\text{CaS}} + I_A + I_{\text{KCa}} + I_H + I_{\text{leak}} + G_{\text{VV}}(V - V_{\text{ax}}))$$

$$C_{\text{ax}} \frac{dV_{\text{ax}}}{dt} = -(I_{\text{Na}} + I_{\text{Kd}} + I_{\text{leakAx}} + G_{\text{VV}}(V_{\text{ax}} - V))$$

onde  $C = 0.628 \text{ nF}$  é a capacitância do soma de área  $0.628 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$ ,  $C_{\text{Ax}} = 0.2 \text{ nF}$  é a capacitância do axônio de área  $\text{Area}_{\text{Ax}} = 0.2 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$ ;  $E_{\text{leak}} = -60.0 \text{ mV}$  é o potencial de reversão para a corrente de fuga;  $g_{\text{Na}} = 120 \text{ mS/cm}^2$ ;  $g_{\text{CaT}} = 1.0 \text{ mS/cm}^2$ ;  $g_{\text{CaS}} = 11.0 \text{ mS/cm}^2$ ;  $g_{\text{KCa}} = 1.22 \text{ mS/cm}^2$ ;  $g_{\text{Kd}} = 36.0 \text{ mS/cm}^2$ ;  $G_{\text{VV}} = 0.0002 \text{ mS/cm}^2$  é a condutância que conecta os dois compartimentos.

As variáveis dinâmicas relacionadas às correntes do soma são calculadas através do potencial  $V$  e as que compõem o axônio são calculadas usando  $V_{\text{ax}}$ .

As propriedades elétricas apresentadas por este modelo bem como a dependência destas propriedades em função do parâmetro de controle  $g_{\text{KCa}}$  são mostradas na seção 5.1.1. O modelo final apresentou um comportamento bastante parecido com dados experimentais de neurônios isolados. Algumas séries temporais obtidas por integração numérica do modelo também são apresentadas naquela seção.

#### 5.1.4. Modelo HHIH

Conforme será mostrado na seção 6, o comportamento coletivo apresentado por redes compostas por neurônios modelo HH2C mostrou-se bastante insatisfatório quanto à geração de padrões rítmicos estáveis e flexíveis. Esta observação nos levou a

modificar a corrente de hiperpolarização  $I_H$ , de forma que houvesse um maior rebote dos neurônios durante e após a inibição.

Foram feitas três modificações no modelo, o aumento da condutância  $g_H$ , a modificação do potencial de reversão para esta corrente e uma modificação na função de ativação  $m_{inf}^H$ .

A condutância para a corrente  $g_H$  foi aumentada de  $0.01 \text{ mS/cm}^2$  para  $0.50 \text{ mS/cm}^2$ . É interessante notar que, apesar desta condutância ter sido aumentada 50 vezes, ela ainda permanece menor que as demais condutâncias do soma (com a exceção do  $g_{leak}=0.01 \text{ mS/cm}^2$ ) e pelo menos duas ordens de grandeza menor que as condutâncias do axônio.

O potencial de reversão  $E_H$  para a corrente foi modificado de  $-20 \text{ mV}$  para  $+20 \text{ mV}$ , o que faz com que a corrente injetada seja mais intensa.

A última modificação consistiu em alterar a curva de ativação  $m_{inf}^H$  desta corrente. A curva é do tipo sigmoide, caracterizada por dois parâmetros:  $V_{slope}$  que controla a inclinação da subida da curva e  $V_{1/2}$  que indica o ponto de inflexão da curva. Modificamos o valor de  $V_{1/2}$  deslocando a curva  $5 \text{ mV}$  para a direita conforme mostrado na Fig. 5.23. Isto faz com que a corrente de hiperpolarização seja ativada para potenciais maiores, fazendo com que o neurônio hiperpolarize menos.

O valor de  $V_{1/2}$  pode ser aumentado em neurônios em cultura através da modificação da expressão de genes que codificam  $I_H$  (Zhang *et al.*, 2003) e através da adição de dopamina (Harris-Warrick *et al.*, 1995).

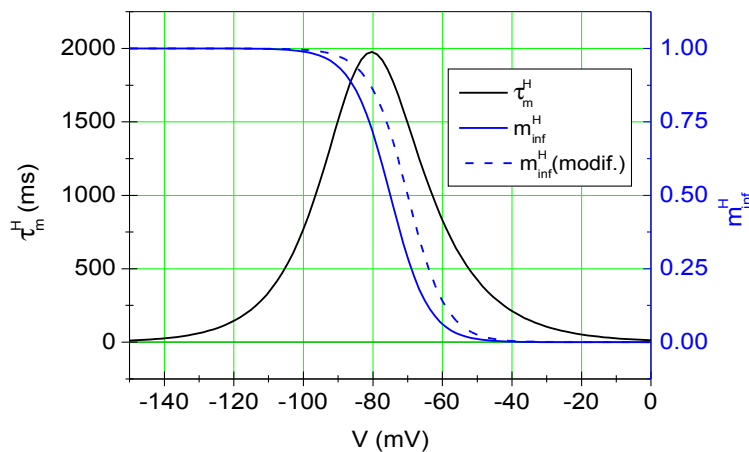
Em nosso modelo, os parâmetros que foram alterados são:

$$E_H = 20 \text{ mV},$$

$$m_{inf}^H = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{V+70}{5.5}\right)},$$

$$g_H = 0.5 \text{ mS/cm}^2.$$

Os demais parâmetros são os mesmos utilizados no modelo HH2C. Estas alterações produziram modificações no comportamento elétrico individual do neurônio, e também mudanças bastante importantes no comportamento coletivo (seções 6.1 e 6.2.4, respectivamente).



**Fig. 5.23: Variáveis dinâmicas que caracterizam a corrente de hiperpolarização  $I_H$ . A escala de  $m_{inf}^H$  está à direita (azul) e a de  $\tau_m^H$  à esquerda (preto). As linhas cheias mostram as curvas para o modelo original (HH1C) e a linha tracejada mostra a modificação introduzida no modelo para potencializar o efeito da corrente  $I_H$ .**

### 5.1.5. Integração das equações e análise dos dados

Utilizamos o método de Runge-Kutta de 6ª ordem com passo adaptativo para a integração das equações diferenciais dos modelos. O método controla o passo de integração para que o erro a cada passo seja menor ou igual a  $10^{-6}$ . A listagem do programa que desempenha a integração é mostrada no Apêndice A.

As variáveis sinápticas são calculadas através da integração analítica da equação (Erro! Vínculo não válido.), assumindo que  $S_\infty$  permanece constante a cada passo de integração. No instante  $t$  conhecemos as variáveis dinâmicas  $S^o$  e

$$S_\infty^o(t) = \tanh\left(\frac{V_{pre}(t) - V_{thres}}{V_{slope}}\right).$$

Com estes valores, as variáveis após um tempo  $dt$  são calculadas como:

$$S_{\infty}(t+dt) = \tanh\left(\frac{V_{pre}(t+dt) - V_{thres}}{V_{slope}}\right)$$

$$S(t+dt) = S_{\infty} + (S^* - S_{\infty}) \exp\left(\frac{-dt}{(1-S_{\infty}^2)\tau}\right),$$

e a corrente sináptica

$$I_{sin} = g_{sin} S(t+dt) (V_{rev} - V_{pos}).$$

A Tabela 3 mostra os parâmetros sinápticos utilizados nas simulações.

Parâmetr	HR	HH (2C e IH)
o	(u.a.)	(mV)
$V_{thres}$	-0.8	-45
$V_{slope}$	2.0	40
$V_{rev}$	-1.58	-80

**Tabela 3: Parâmetros sinápticos para os modelos HR, HH2C e HH1H que foram utilizados nas simulações.**

Ao final de cada integração as condições finais (variáveis dinâmicas no último instante da integração) foram salvas em arquivo. No início de uma nova integração, o programa lia estas variáveis e as utilizava como condição inicial. Descartamos os 10s iniciais de cada série temporal.

Nas simulações com dois neurônios, estes foram conectados através de sinapses inibitórias mútuas e idênticas, formando o que é conhecido na literatura como uma rede de inibição recíproca, conforme mostrado na Fig. 5.24. Utilizamos os mesmos conjuntos de parâmetros nos dois neurônios, de modo que eles têm comportamentos intrínsecos idênticos.

Quando os neurônios que compõem a rede são disparadores endógenos, o comportamento típico desta rede consiste nos dois neurônios sincronizados em antifase, devido às sinapses inibitórias. Quando o primeiro neurônio dispara um trem de potenciais de ação o segundo é inibido e permanece hiperpolarizado até que consiga

vencer a inibição, ou até que o primeiro neurônio pare de disparar. Então o segundo neurônio dispara e o ciclo se reinicia.

**Fig. 5.24: Esquema da conexão sináptica entre os neurônios mostrando as sinapses inibitórias mútuas e dois principais parâmetros. O parâmetro  $g_{sin}$  representa a condutância sináptica máxima das sinapses e  $\lambda$  controla a atividade intrínseca dos neurônios, levando-os de um comportamento em rajadas para tônico, passando pelo comportamento caótico.**

Estudamos o comportamento da rede em função de dois parâmetros que possuem uma correspondência direta com grandezas que exercem papéis importantes em redes neurais biológicas. Estes dois parâmetros podem sintetizar grande parte dos efeitos das substâncias neuromoduladoras presentes em redes neurais. O parâmetro  $\lambda$  controla a atividade intrínseca dos neurônios e o  $g_{sin}$  controla a intensidade da conexão sináptica entre eles (Fig. 5.24). O estudo do funcionamento da rede em função do parâmetro  $\lambda$  pode revelar como características individuais dos neurônios influenciam na formação dos padrões temporais da rede. A dependência do comportamento intrínseco em relação a este parâmetro para os diversos modelos, e o que ele representa em cada um, são mostrados na seção 6.1. O parâmetro que controla a condutância sináptica representa, de uma forma simplificada, o efeito de neuromoduladores sobre uma rede, haja vista que grande parte da atividade moduladora se dá através de modificações em parâmetros sinápticos (Marder, 1998). É sabido, no entanto, que a modulação não influencia somente a intensidade das conexões sinápticas, mas também a atividade individual dos neurônios (Marder, 1998), o que equivale a modificar simultaneamente esses dois parâmetros. Este efeito será explorado também nas seção 6.2.4.

Ao percorrermos o espaço de parâmetros através de linhas verticais, podemos estudar como a variação da condutância

sináptica altera as grandezas medidas (frequência e número de potenciais de ação por salva, por exemplo) para um tipo de comportamento intrínseco, determinado pelo valor da abscissa (parâmetro  $\lambda$ ). Isto representa a ação de uma substância neuromoduladora que regula apenas a intensidade da condutância das sinapses entre os neurônios, de acordo com sua concentração no meio extracelular. De forma similar, percorrer o gráfico através de linhas horizontais pode ser interpretado como diferentes tipos de comportamentos individuais determinam o funcionamento da rede para um mesmo valor da condutância sináptica  $g_{sin}$  (Fig. 5.25). Neuromoduladores reais atuam simultaneamente nos dois parâmetros e seus efeitos podem ser descritos observando o comportamento da rede em curvas  $g_{sin} \times \lambda$ .

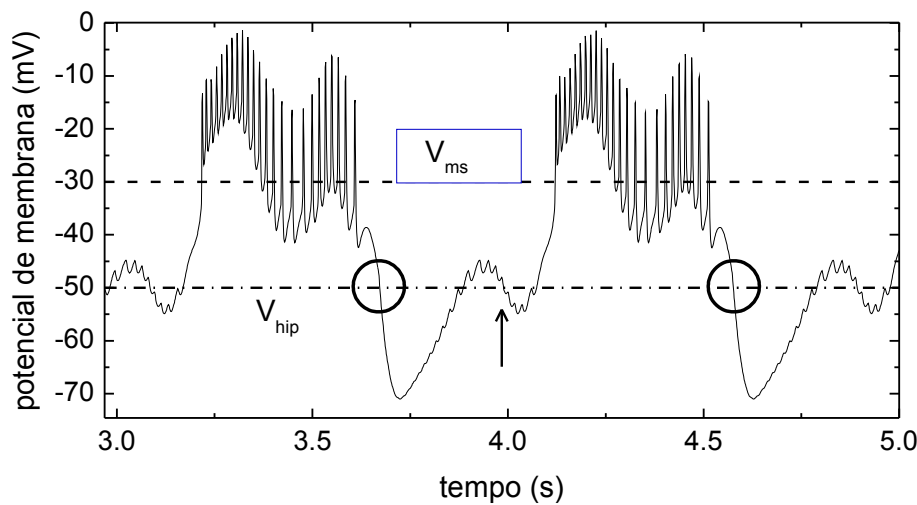
**Fig. 5.25: Interpretação dos resultados mostrados em espaços de parâmetros. Na abscissa está o parâmetro  $\lambda$  que determina qual é o comportamento individual do neurônio, que varia de tônico a rajadas. Na ordenada está o parâmetro  $g_{sin}$ , que determina a intensidade da conexão sináptica entre os neurônios. Para um determinado valor de  $\lambda$ , a ação de neuromoduladores que atuam na conexão sináptica pode ser analisada percorrendo o espaço de parâmetros através de linhas verticais. Da mesma maneira, linha horizontais mostram o efeito de modificações do comportamento intrínseco dos neurônios para a mesma intensidade das sinapses.**

Utilizamos a seguinte seqüência para construir os espaços de parâmetros: o parâmetro que define o comportamento intrínseco do neurônio ( $\lambda$ ) foi fixado em um valor que deixa o comportamento intrínseco do neurônio em rajadas. A condutância sináptica foi fixada em zero, deixando os neurônios isolados. Então foram feitas a integração das equações e as diversas medidas com as séries temporais para cada valor da condutância, até o valor máximo estabelecido. Em seguida, o parâmetro  $\lambda$  foi modificado de um pequeno passo, deixando o comportamento individual dos neurônios mais próximo de tônico e o procedimento repetido até que toda a faixa de parâmetros fosse coberta. As condições finais

de cada integração foram utilizadas como condições iniciais para a integração seguinte.

A análise das séries temporais foi feita ao longo da integração das equações para não haver necessidade de salvar as variáveis dinâmicas em disco, economizando tempo de computação e memória.

A frequência de oscilação dos neurônios foi medida pela detecção dos instantes em que os neurônios iniciavam a hiperpolarização. Definimos um nível de detecção e guardamos o instante em que o potencial de membrana cruzava este nível (Fig. 5.26). Em seguida, a detecção era desativada até que o neurônio disparasse um potencial de ação, caracterizando um ciclo de disparo e evitando medidas espúrias. Quando era detectada uma nova hiperpolarização, calculávamos um valor de frequência como o inverso do tempo decorrido entre as hiperpolarizações. A cada nova hiperpolarização obtínhamos uma nova medida da frequência. Ao final da integração, calculávamos a média e o desvio padrão das diversas medidas.



**Fig. 5.26: Série temporal de um neurônio mostrando os níveis utilizados para a detecção das hiperpolarizações e dos potenciais de ação. A detecção de potenciais de ação só é ativada quando o potencial de membrana é superior a  $V_{ms}$  (linha tracejada). Os inícios das hiperpolarizações são determinados pelo cruzamento do potencial de membrana com a linha  $V_{hip}$  (linha traço-ponto), identificados pelos círculos. A seta mostra um cruzamento que não é detectado pois a rotina é desativada até que a célula passe novamente por  $V_{ms}$ .**

Uma rotina de detecção de picos foi utilizada para a determinação dos instantes dos disparos dos potenciais de ação dos neurônios. A variação do potencial de membrana  $\Delta V_n = V_{n+1} - V_n$  no instante  $t_n$  foi calculada a cada instante e comparada com a variação no instante anterior  $\Delta V_{n-1}$ . Quando havia uma mudança de sinal na derivada ( $\Delta V_n \times \Delta V_{n-1} \leq 0$  e  $\Delta V_n \leq 0$ ) associávamos  $t_n$  a um instante de disparo. A rotina de procura pelos picos somente era ativada quando o potencial de membrana era superior a um limite pré-estabelecido  $V_{ms}$ , para evitar a detecção de máximos locais que não eram potenciais de ação.

O número de potenciais de ação por rajada foi obtido diretamente do número de picos acima de  $V_{ms}$  entre duas hiperpolarizações. Ao final da integração também calculamos a média e o desvio padrão das medidas.

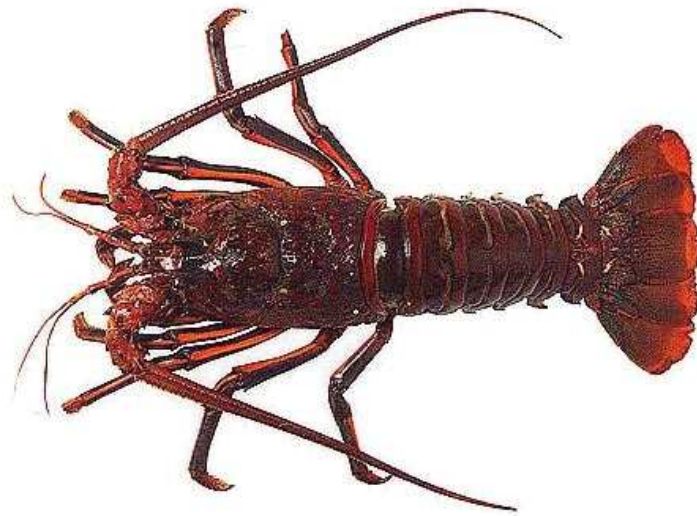


Para a construção dos diagramas de bifurcações integramos as equações por um período para eliminar o comportamento transiente e em seguida salvamos em disco os valores do parâmetro e os diversos valores dos intervalos entre disparos (ISIs). Para o modelo HR, descartamos os primeiros 10 segundos e para os modelos HH2C e HHH, 20 segundos. O tempo total durante o qual foram salvos os ISIs foi de 20 segundos para o modelo HR e 100 segundos para os outros dois modelos.

Para a análise dos experimentos os dados do neurônio biológico e do neurônio modelo foram salvos em formato de texto para serem lidos pelo programa de análise. A partir da leitura destes dados, a rotina de análise utilizava um procedimento similar à utilizada no programa de integração das equações. A diferença é que a detecção dos potenciais de ação do neurônio biológico foi feita através da medida extracelular, onde o pico é muito mais pronunciado. A listagem do programa de análise é mostrada no Apêndice B.

## **5.2. Métodos experimentais**

As lagostas *Panulirus interruptus* (Fig. 5.27) são pescadas na costa da Califórnia, EUA, e mantidas em água marinha, com temperatura e salinidade controladas até o seu uso. Os animais não são alimentados durante este período para que o tecido gorduroso diminua e o sistema nervoso seja identificado e dissecado mais facilmente.



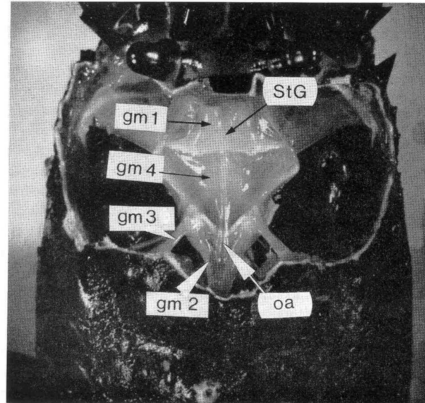
**Fig. 5.27: Lagosta *Panulirus interruptus* intacta.**

O animal é mantido em gelo fundente para que seu metabolismo seja reduzido, o que ocorre em aproximadamente quarenta minutos. A carapaça é aberta inicialmente pela parte lateral anterior dorsal, tomando-se o cuidado de deixar a pele que se encontra logo abaixo da carapaça intacta. Remove-se então a parte anterior da carapaça de forma que o estômago fique exposto (Fig. 5.28) e possa ser removido.

Após a remoção do estômago, este é lavado repetidamente com uma solução fisiológica específica, removendo os sucos gástricos que poderiam danificar o sistema nervoso, e aberto na linha média ventral desde o esôfago até o intestino. Mais dois cortes laterais na direção dos ossículos (dentes) permitem que o estômago adquira um perfil plano que facilita sua fixação a uma placa de dissecação.

O sistema nervoso estomatogástrico (Harris-Warrick *et al.*, 1992), que consiste do STG e dos gânglios comissurais e esofágico e seus nervos conectores e motores, é separado da superfície do estômago (Mulloney e Selverston, 1974) e fixado por pinos de aço inox em uma placa de Petri cujo fundo contém uma camada de silicone transparente (Fig. 5.29). O sistema nervoso permanece

submerso em solução fisiológica que é permanentemente renovada por um sistema de perfusão (Fig. 5.29).



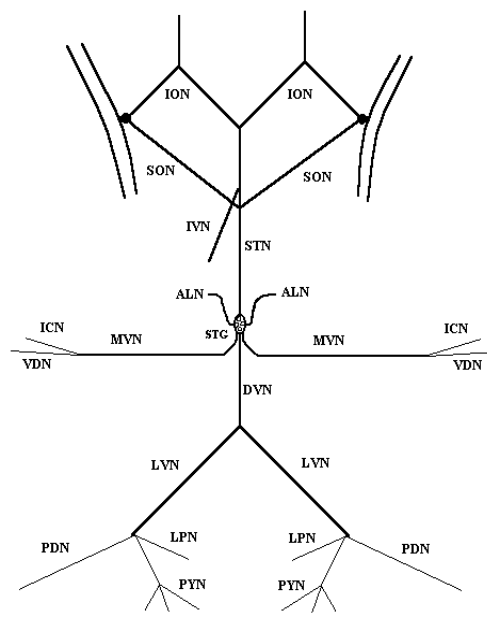
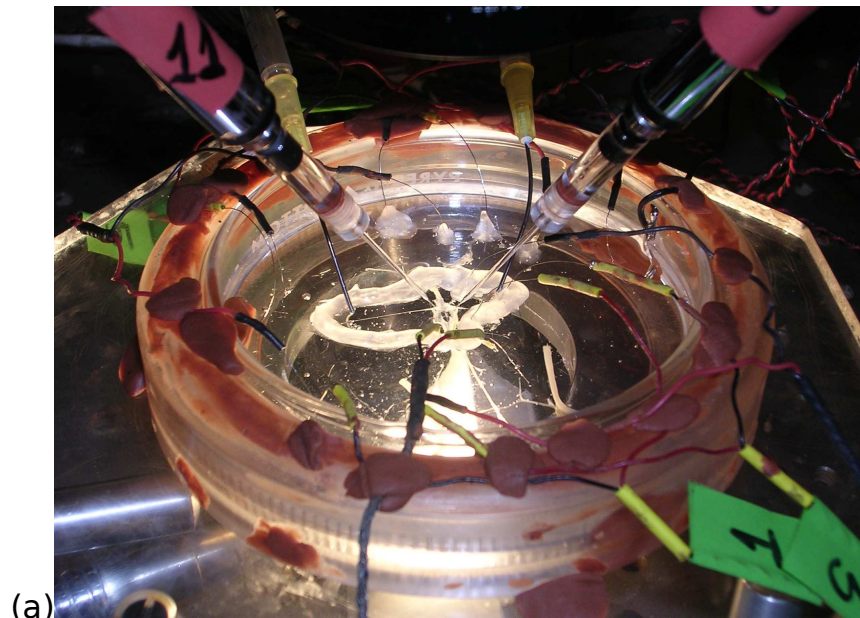
**Fig. 5.28: Estômago da lagosta após a retirada da carapaça que o cobre, mostrando alguns músculos e nervos que compõem sua anatomia. Nesta foto, a parte anterior do animal fica acima na figura. A posição aproximada do gânglio estomatogástrico (STG) é indicada.**

Em seguida, a membrana que recobre o gânglio é removida em uma microcirurgia, deixando os neurônios expostos para serem empalados com eletrodos intracelulares. Com uma tesoura para iridectomia e uma pinça pequena, a membrana que envolve o gânglio é pinçada, levantada e cortada, formando uma pequena abertura. Através desta abertura inicia-se o corte da membrana ao redor do gânglio removendo-a completamente e deixando expostos os corpos celulares dos neurônios (Fig. 5.30).

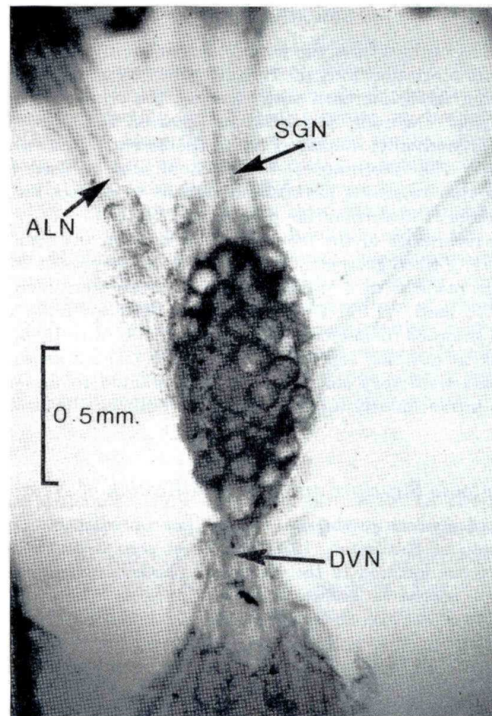
Em algumas das ramificações nervosas, como os nervos ventral lateral (LVN) e ventral medial (MVN), colocamos eletrodos extracelulares por onde podemos monitorar a atividade da maioria dos neurônios do circuito pilórico. A Fig. 5.31 mostra duas medidas simultâneas dos nervos LVN e MVN que mostram a atividade pilórica. Estas medidas são utilizadas para a identificação dos neurônios e para a monitoração do ritmo do circuito durante o experimento.

Em seguida empalamos os diversos neurônios visíveis e os identificamos através do padrão de atividade temporal do potencial

de membrana, bem como pela comparação desta atividade com as medidas extracelulares (Fig. 5.32).

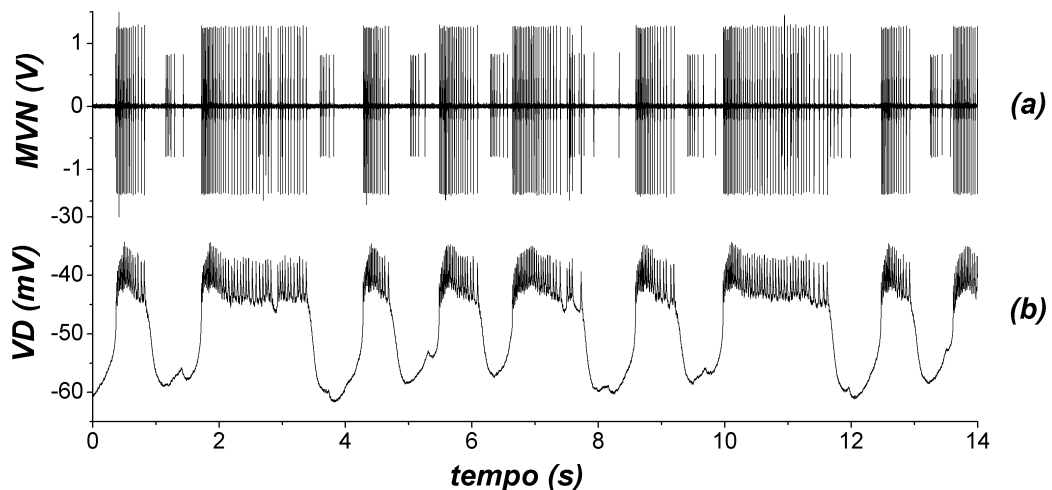


**Fig. 5.29: (a) O sistema nervoso estomatogástrico fixado à placa de Petri com diversos eletrodos extracelulares e dois eletrodos intracelulares. (b) Esquema da forma com que o circuito estomatogástrico é posicionado, mostrando suas principais ramificações nervosas.**



**Fig. 5.30: O STG observado através do microscópio de dissecção. Os corpos celulares dos neurônios são claramente visíveis. Extraído de Mulloney e Selverston (1974).**

**Fig. 5.31: Atividade elétrica medida nos nervos LVN e MVN que mostra o ritmo pilórico. As setas indicam a quais neurônios do circuito pilórico pertencem os potenciais de ação.**



**Fig. 5.32: (a) Medida extracelular feita no nervo MVN. (b) Medida intracelular do neurônio VD. As duas medidas mostram a correspondência entre os disparos do neurônio VD com os disparos observados na medida extracelular que permite a identificação dos neurônios.**

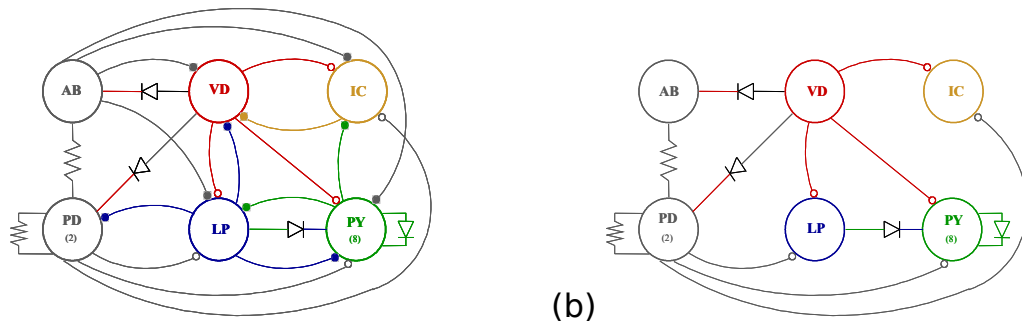
O CPG pilórico é uma pequena rede neural que controla os músculos do piloro, que filtra e bombeia o alimento em digestão para o intestino. Este CPG é composto por 6 grupos de neurônios: um neurônio disparador anterior (AB), dois neurônios dilatadores (PDs), um neurônio dilatador ventricular (VD), um neurônio lateral (LP), um neurônio cardíaco inferior (IC) e 8 constritores (PY). O ritmo periódico produzido pelo CPG pilórico apresenta 3 fases, na seguinte ordem:

$$AB/PD \rightarrow LP/IC \rightarrow VD/PY,$$

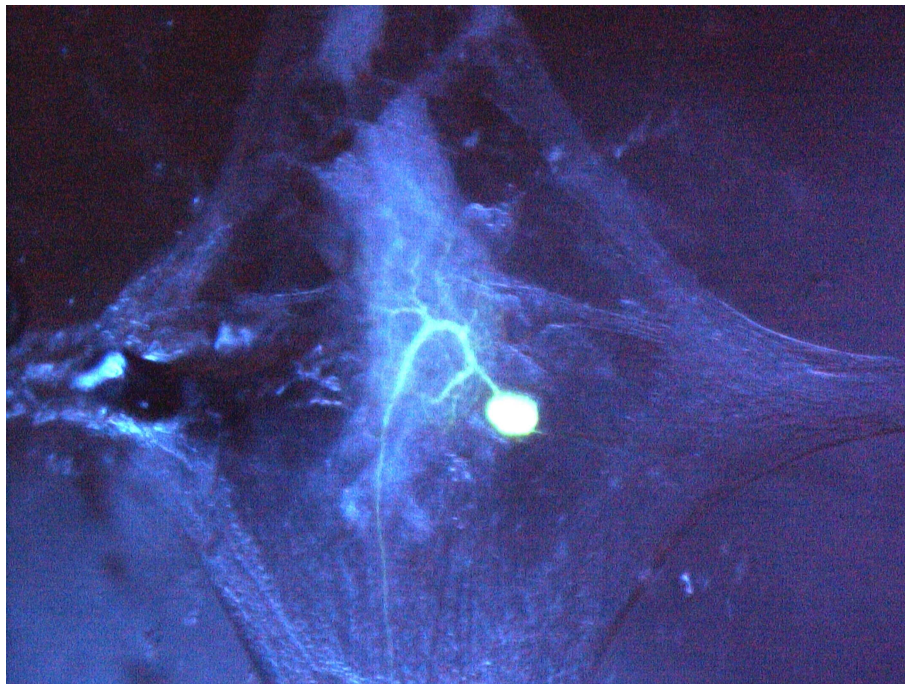
e a frequência com que este ciclo é repetido pode ser modificada entre 0.7 e 2.5 Hz aproximadamente. Com exceção do neurônio AB, chamado também de marca-passo, todos os neurônios do CPG pilórico apresentam atividade caótica de disparos quando isolados do circuito.

Quando todos os neurônios necessários ao experimento são encontrados, circundamos o gânglio com uma parede de vaselina formando um poço que é preenchido com uma solução fisiológica acrescida de picrotoxina (PTX)  $10^{-6}$  M. Este procedimento bloqueia as sinapses glutamatérgicas (Fig. 5.33). Após a aplicação de PTX os neurônios ainda permanecem conectados por sinapses colinérgicas e elétricas, que não são bloqueadas pela substância.

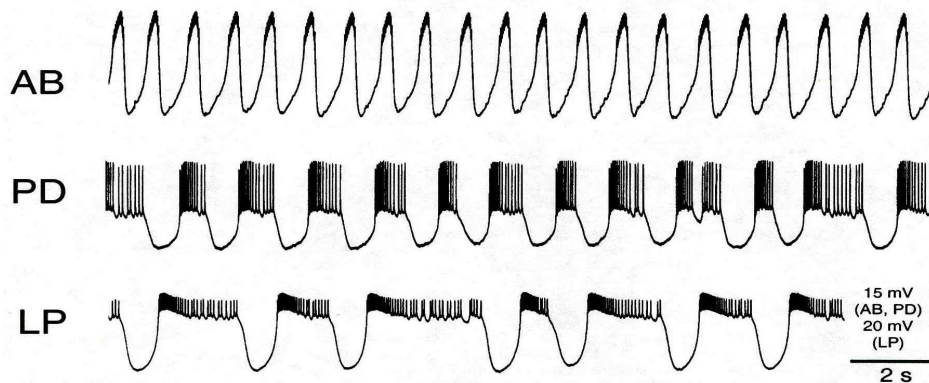
A técnica de fotoinativação é utilizada para completar o isolamento de outros neurônios de suas conexões sinápticas. Esta técnica consiste em preencher o neurônio com carboxifluorecina e iluminá-lo por aproximadamente 20 minutos com luz azul (Miller e Selverston, 1979), quando a atividade do neurônio cessa. A Fig. 5.35 mostra a atividade de alguns neurônios do circuito pilórico quando isolados completamente de suas conexões sinápticas.



**Fig. 5.33: (a) Esquema do circuito pilórico completo, contendo todos os neurônios componentes e suas respectivas conexões sinápticas. As sinapses representadas por círculos cheios são mediadas por glutamato (sinapses glutamatérgicas), as representadas por círculos abertos são mediadas por acetilcolina (sinapses colinérgicas) e as demais são sinapses elétricas. (b) Representação da ação da picrotoxina (PTX) no circuito: as sinapses glutamatérgicas são removidas. Com a inativação do neurônio AB e dos dois PDs é possível isolar o neurônio VD. O neurônio LP pode também ser isolado com a inativação dos PDs e do VD.**



**Fig. 5.34: Neurônio preenchido com carboxifluorecina e iluminado com luz azul. Após aproximadamente 15 minutos sob a iluminação a atividade do neurônio pára completamente.**



**Fig. 5.35: Atividade elétrica intrínseca de neurônios isolados do CPG pilórico do STG. Métodos de isolamento: AB : VD e PDs fotoativados e aplicação de PTX; PD : AB e VD fotoativados e aplicação de PTX; LP : PDs fotoativados e aplicação de PTX.**

Como estávamos interessados em analisar o comportamento dos neurônios próximos de um comportamento caótico, utilizamos os neurônios LP e VD em nossos experimentos, pois podem ser isolados mais facilmente e sempre apresentam comportamentos irregulares quando isolados.

Uma vez isolado, o neurônio foi conectado a um programa DClamp adaptado (veja seção 5.3), capaz de conectar este neurônio a um neurônio modelo, calculando e produzindo as correntes pós-sinápticas a serem injetadas. O próprio programa Dclamp se encarrega da integração das equações dos modelos. Utilizamos dois eletrodos intracelulares, um responsável por medir o potencial de membrana e o outro para injetar a corrente pós-sináptica gerada pelo DClamp.

Cada modelo de atividade neural (HR e HH2C) foi conectado ao neurônio biológico e fizemos medidas diversas da atividade dos dois neurônios para diversos valores da condutância sináptica. A Fig. 5.36 mostra alguns exemplos de medidas dos neurônios acoplados.

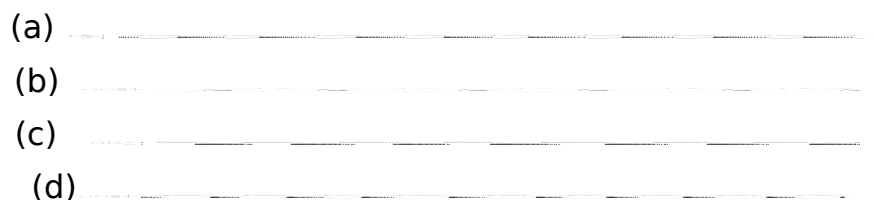
A atividade dos neurônios biológicos foi modificada através da injeção de corrente contínua no soma pelo eletrodo de corrente. Correntes positivas tendem a deixar o neurônio mais próximo de



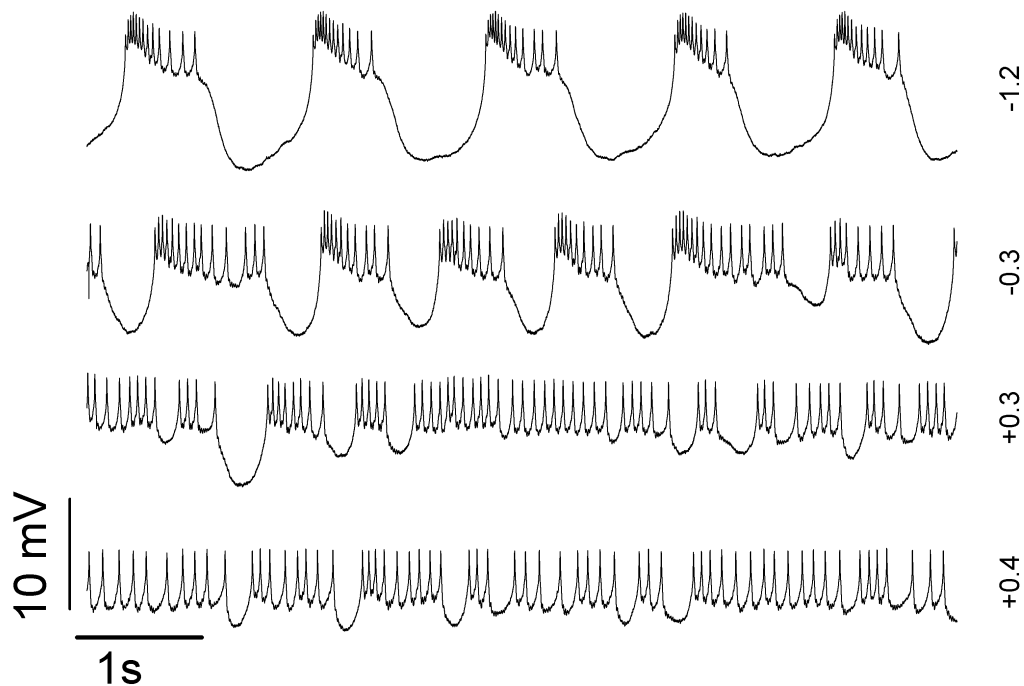
comportamento tônico, e correntes negativas levam o neurônio para um comportamento em rajadas, conforme mostrado na Fig. 5.37. Em cada um dos neurônios modelo foi variado o parâmetro que controla o seu comportamento intrínseco, conforme mostrado na seção 6.1,  $I$  para o modelo HR e  $g_{KCa}$  para o modelo HH2C.

No início de cada série de medidas, os dois neurônios isolados foram ajustados para se comportarem de maneira semelhante, tanto no valor da frequência de rajadas quanto na regularidade do comportamento. Os neurônios foram colocados em três tipos de comportamentos diferentes: em rajadas, irregular e tônico. O comportamento em rajadas do neurônio biológico não é completamente periódico, devido ao ruído experimental. Chamamos de irregular o comportamento caótico em rajadas.

Para cada tipo de comportamento intrínseco, medimos a atividade dos neurônios conectados por diversos valores da condutância sináptica  $g_{sin}$ , desde valores próximos de zero, até valores onde os neurônios se tornam fortemente conectados.



**Fig. 5.36: Algumas séries temporais de neurônios biológicos conectados a neurônios modelos através do programa de fixação dinâmica de corrente DClamp. Em cada caso o neurônio biológico (VD ou LP) e o neurônio modelo (HR ou HH2C) são identificados pela sigla ao lado das séries.**

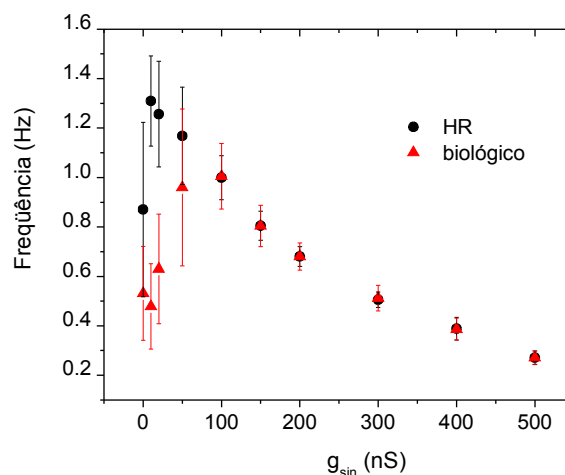


**Fig. 5.37: Séries temporais mostrando como o comportamento intrínseco de um neurônio LP é modificado em função da corrente injetada no soma (em nA à direita da figura). Correntes negativas levam o neurônio para o comportamento em rajadas e correntes positivas levam o neurônio para o comportamento tônico.**

Como os neurônios biológicos e os neurônios modelo reagem de maneira diferente à injeção de correntes sinápticas, ajustamos os valores das condutâncias para que as oscilações ficassem o mais simétricas possível.

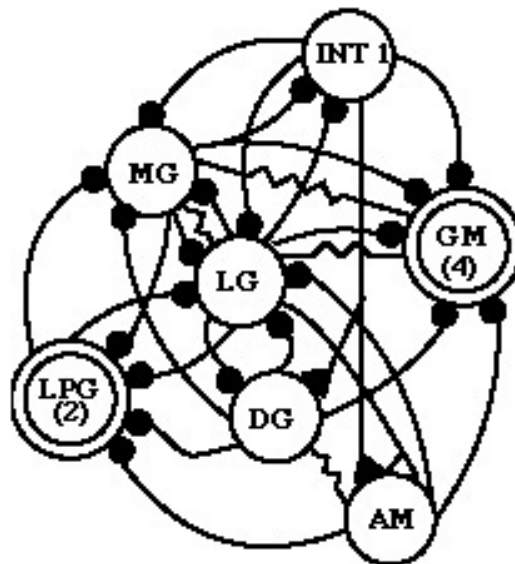
Depois de digitalizadas e gravadas em disco as séries temporais dos neurônios acoplados, utilizamos um programa computacional que analisa as séries temporais e identifica os disparos dos neurônios e as hiperpolarizações, medindo assim a frequência com que os neurônios oscilam. O programa foi elaborado em linguagem C e é similar ao utilizado nas simulações, porém com certas adaptações para evitar dados espúrios decorrentes do ruído experimental.

Com base nas medidas das freqüências de rajadas para as diversas séries temporais, construímos os gráficos da freqüência de rajadas em função da condutância sináptica para os neurônios e para os diversos parâmetros. A Fig. 5.38 mostra um exemplo de qual foi o critério que utilizamos para mostrar os dados experimentais. Neste caso os dois neurônios foram ajustados para apresentar comportamento em rajadas. Incluímos também nesta figura as medidas das freqüências dos neurônios isolados, representadas pelos dois pontos de abscissa  $g_{sin}=0$ . Para  $g_{sin}<50nS$  os neurônios não sincronizam completamente, apresentando freqüências diferentes. Em todos os resultados experimentais, omitimos estes pontos, mostrando somente os dados correspondentes aos neurônios sincronizados. A freqüência da rede é medida com o neurônio modelo por facilidade, o que não representa nenhuma perda já que as freqüências são experimentalmente iguais quando os neurônios estão sincronizados. Como exemplo, no caso da Fig. 5.38 seriam mostrados somente os pontos pretos e para  $g_{sin} \geq 150 nS$ .



**Fig. 5.38: Freqüência de rajadas dos neurônios em função da condutância sináptica mostrando que inicialmente os neurônios têm freqüências ligeiramente diferentes e que as freqüências se igualam quando a condutância é aumentada, em consequência da sincronização em oposição de fase.**

Além do CPG pilórico, responsável pela filtragem e bombeamento do alimento em digestão para o intestino, o STG possui um CPG gástrico (Fig. 5.39), responsável pelo movimento dos ossículos que desempenham o papel dos dentes na mastigação do alimento. Ao contrário do CPG pilórico, o CPG gástrico não possui nenhum neurônio marca-passo nem mesmo neurônios disparadores endógenos. Todo o ritmo emerge como uma propriedade coletiva e acredita-se que correntes ativas durante a hiperpolarização (como  $I_H$ ) e o rebote pós-inibitório são os responsáveis pela geração e controle do ritmo.



**Fig. 5.39: Esquema de conexões sinápticas do CPG gástrico do STG. INT 1: interneurônio 1, MG: neurônio gástrico medial, LG: neurônio gástrico lateral, DG: neurônio gástrico dorsal, AM: neurônio anterior médio, GM: neurônios da moela gástrica, LPG: neurônios gástricos laterais posteriores. Os pequenos círculos negros representam sinapses químicas inibitórias e os símbolos de resistores representam o acoplamento elétrico direto entre as células.**

O CPG gástrico possui 7 tipos de neurônios (que também são identificáveis comparando-se medidas intra e extra-celulares): um interneurônio (INT 1), um neurônio gástrico medial (MG), um neurônio gástrico lateral (LG), um neurônio gástrico dorsal (DG), um neurônio anterior médio (AM), 4 neurônios da moela gástrica (GM) e

2 neurônios gástricos laterais posteriores (LPG). O ritmo produzido possui 5 fases: num primeiro momento o INT 1 dispara e inibe fortemente todos os neurônios do CPG, então os neurônios LG e MG se recuperam da inibição e disparam acionando os músculos que separam os 2 dentes laterais. O pedaço de alimento é movido para a região entre estes dentes neste momento. Os neurônios LPG disparam fechando os dentes laterais e prendendo o alimento. Os neurônios MG disparam e movem o dente médio para a frente e para baixo contra o alimento que está sendo segurado pelos dentes laterais. Finalmente os neurônios DG e AM voltam o dente médio pra sua posição original e o ciclo se repete com um período que pode ser regulado de 3 a 12 segundos. A sequência é:

INT1 → LG/MG → LPGs → MGs → DG/AM

Neste trabalho utilizamos o CPG gástrico em experimentos para mostrar que é possível restaurar o ritmo gástrico, danificado pela ausência de neuromoduladores, usando um neurônio modelo SN.

### ***5.3. Construção de redes neurais híbridas - o protocolo Dynamic Clamp***

Sendo o STG um sistema complexo, é extremamente difícil compreender o comportamento da rede analisando os neurônios isoladamente. Para uma melhor compreensão dos mecanismos de geração de padrões, conectamos os neurônios modelo a neurônios biológicos, verificando qual o padrão estabelecido nessas redes híbridas. Para isso foi necessário utilizar técnicas para produzir

sinapses artificiais entre neurônios modelo e neurônios biológicos em tempo real.

Baseamo-nos no protocolo conhecido como Dynamic Clamp (Sharp *et al.*, 1993a,b; Pinto *et al.*, 2001). A implementação do nosso protocolo envolve a repetição de um ciclo de três estágios. O primeiro é a aquisição dos dados dos potenciais de membrana das células, o que é feito, no caso do neurônio biológico, através dos amplificadores intracelulares usuais conectados a uma placa de conversão analógico-digital (ADC) e, no caso do neurônio modelo, o computador tem acesso direto à variável que corresponde ao potencial de membrana. O segundo estágio refere-se à computação: utilizando os valores dos potenciais medidos e modelos matemáticos para as condutâncias sinápticas o programa calcula a corrente que seria injetada no neurônio pós-sináptico. O terceiro e último ciclo consiste em atualizar o valor das correntes sinápticas injetadas nos neurônios. Para o neurônio biológico, é enviado um sinal para o conversor digital-analógico (DAC), que o converte em corrente analógica. Esta corrente é enviada ao amplificador que a injeta na célula através de um eletrodo intracelular. Para o neurônio modelo, a variável dinâmica correspondente à corrente sináptica é atualizada na memória do computador.

A repetição deste ciclo garante que a corrente injetada nos neurônios varie dinamicamente com o potencial de membrana medido, de acordo com as condutâncias e com a configuração de conexões sinápticas pré-estabelecidas, estabelecendo a comunicação entre o modelo e o neurônio biológico.

Embora não tenha sido originalmente projetado para isto, o programa DClamp (Pinto *et al.*, 2001) pode ser adaptado para executar tanto a conexão sináptica entre neurônios como também a integração das equações diferenciais dos modelos. Para isto, incluímos no ciclo intermediário, a computação relativa à integração

das equações diferenciais dos modelos de neurônios. Aliando estes dois fatores, podem-se realizar experimentos com redes neurais híbridas, acoplando neurônios *in vitro* a neurônios modelo *in silico*.

A vantagem de tais experimentos está no fato de podermos observar e comparar a resposta de modelos ao serem conectados aos neurônios biológicos verificando o desempenho dos diversos modelos.

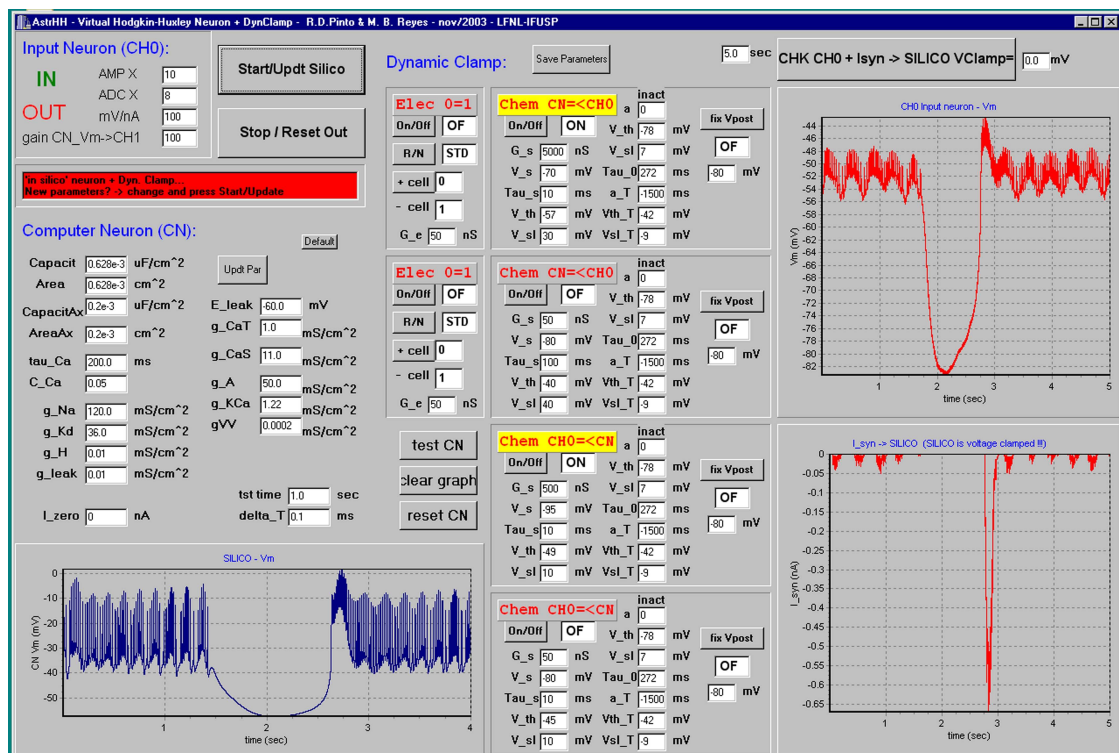
Modificamos a rotina do DClamp produzindo três novas versões, cada uma capaz de conectar um dos modelos de atividade neural com um neurônio biológico. Os modelos que utilizamos neste trabalho foram o HR e o HH2C. Posteriormente, foi também criada uma versão capaz de integrar os modelos estocásticos HH1C e HH2C em tempo real.

O DClamp tem um ciclo assíncrono, que não é executado em intervalos exatamente iguais. Assim, o passo de integração das equações diferenciais não é constante e depende do próprio tempo que o ciclo total demora a ser executado. Para modelos de baixa dimensão como o HR, o tempo necessário para integrar as equações é praticamente desprezível em comparação com o ciclo total do DClamp. No entanto, para modelos do tipo HH acima de 10 dimensões, o tempo para a integração das equações é da ordem de grandeza do ciclo do DClamp. Isto pode tornar o ciclo muito longo, inviabilizando a atualização das correntes em tempo real, ou eventualmente pode causar instabilidades ou divergências numéricas na integração das equações.

Esta dificuldade técnica exigiu que efetuássemos modificações na rotina de integração de forma a proteger as equações contra divergências. As modificações se mostraram satisfatórias e os programas foram utilizados com sucesso nos experimentos cujos resultados podem ser vistos na seção 7.

Para a integração utilizamos um método de Runge-Kutta de 6ª ordem. A cada ciclo do DClamp, o intervalo de tempo desde a última atualização das variáveis dinâmicas é utilizado como passo de integração. Para os modelos de maior dimensão, integramos as equações em quatro passos iguais a cada ciclo do DClamp, diminuindo o passo de integração para evitar divergências numéricas.

Na Fig. 5.40 mostramos o painel de controle do DClamp que desenvolvemos para o modelo HH2C. À direita são mostradas as sinapses artificiais que podem ser implementadas entre o neurônio modelo e o neurônio biológico.



**Fig. 5.40: Painel de controle do DClamp**



## 6. Resultados Numéricos

A seguir mostramos os principais resultados obtidos com a integração numérica de alguns modelos de atividade neural. Estas simulações foram feitas para neurônios isolados e para redes de dois e três neurônios.

Inicialmente, caracterizamos a atividade intrínseca dos modelos analisando o comportamento de cada um deles em função de um parâmetro de controle. Em seguida, verificamos como alguns destes modelos se comportam coletivamente, ou seja, quando conectados sinapticamente a outros neurônios, e como certas propriedades individuais podem influenciar na determinação do padrão rítmico nestas pequenas redes.

### ***6.1. Caracterização do comportamento dos neurônios isolados***

Em nossas simulações, utilizamos modelos que descrevem a atividade de neurônios que disparam potenciais de ação em forma de rajadas, pois é o comportamento típico dos neurônios do circuito pilórico do gânglio estomatogástrico dos crustáceos, principal motivação experimental do nosso trabalho. Apesar desta motivação específica, neurônios com este tipo de propriedade desempenham um papel importante em sistemas mais complexos, inclusive no sistema nervoso humano (Llinás, 1988; Jacklet 1989).

Para cada neurônio modelo, utilizamos um parâmetro de controle que produz no sistema uma transição entre o comportamento em rajadas e o comportamento tônico. Esta escolha

também é baseada no fato experimental de que os neurônios do circuito pilórico encontram-se próximos desta transição quando isolados de suas conexões sinápticas.

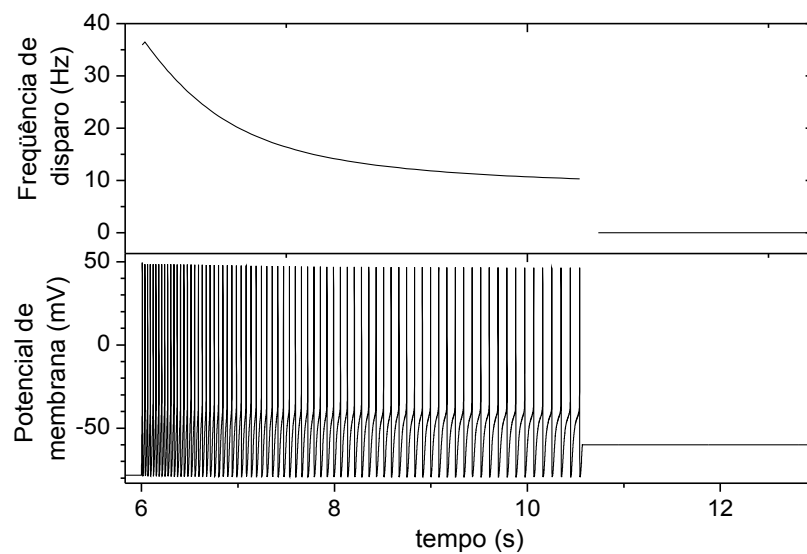
Em termos funcionais, podemos destacar duas principais propriedades: a frequência média de rajadas e o número de potenciais de ação por salva. A primeira representa a frequência com que o neurônio dispara os trens de potenciais de ação e, em neurônios motores, está ligada à frequência de acionamento dos músculos. A segunda tem uma relação com a taxa de disparo de potenciais de ação, que por sua vez influencia a intensidade de acionamento muscular devido a um aumento da corrente pós-sináptica total (Bear *et al.*, 2002). Além disto, estas duas características estão relacionadas aos possíveis comportamentos coletivos que os neurônios podem assumir quando conectados em uma rede, como veremos nas seções posteriores.

A caracterização dos modelos foi feita através de medidas destas características do comportamento temporal dos neurônios modelo. A seguir, apresentamos os principais resultados da caracterização dos modelos SN, Hindmarsh-Rose, HH2C, e HHIH.

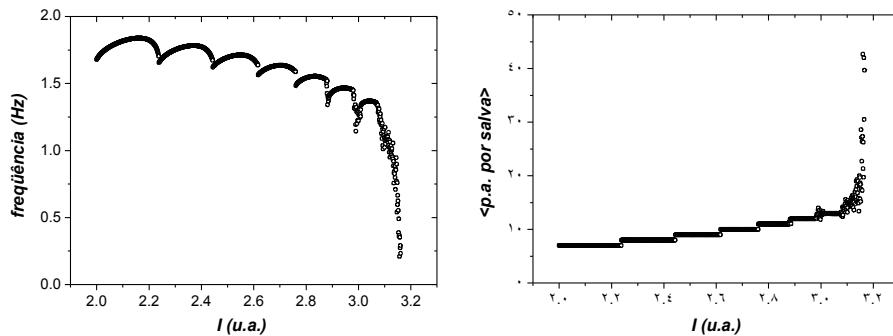
No caso do modelo SN, estas medidas não são possíveis, já que o seu comportamento é silencioso quando não recebe nenhuma inibição sináptica. Uma amostra do comportamento deste modelo em resposta a um pulso inibitório pode ser vista na Fig. 6.41, na qual o neurônio dispara potenciais de ação logo após o término da inibição em uma frequência que diminui gradativamente, fazendo com que o neurônio deixe de disparar.

A Fig. 6.42 mostra a frequência de rajadas para o modelo de HR em função do parâmetro  $I$ . Nesta figura nota-se que o valor da frequência tem uma queda abrupta quando o sistema está próximo de se tornar tônico ( $I \approx 3,15$ ). Esta queda está relacionada ao fato das hiperpolarizações se tornarem cada vez menos frequentes e

menores tanto em amplitude como em duração, deixando de ser detectadas. Assim, são observadas rajadas cada vez mais longas, fazendo com que a frequência diminua. Isto não representa nenhuma interferência nos resultados que se seguem, já que este comportamento é também observado em experimentos com neurônios isolados, quando é injetada uma corrente despolarizante.

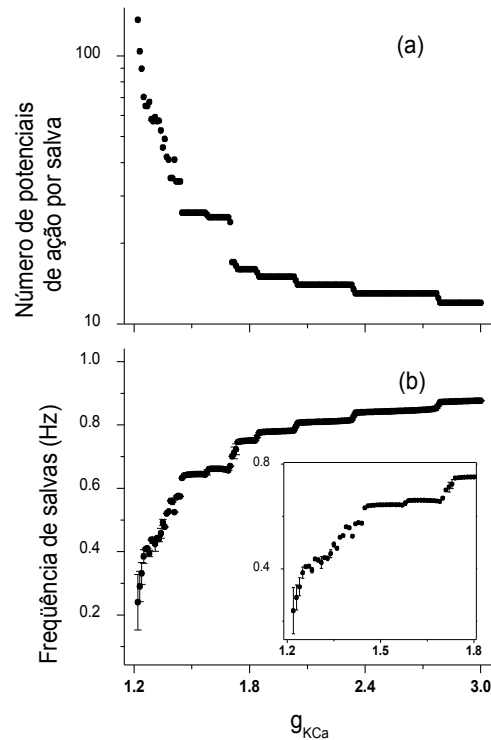


**Fig. 6.41: Exemplo de rebote pós inibitório: O potencial de membrana do neurônio modelo é fixado em  $-78mV$  e liberado a partir de  $t=6s$ . A partir daí o neurônio passa a disparar potenciais sucessivos a uma taxa disparo que decai com o tempo (gráfico acima). O neurônio pára de disparar após aproximadamente  $10,7s$ .**

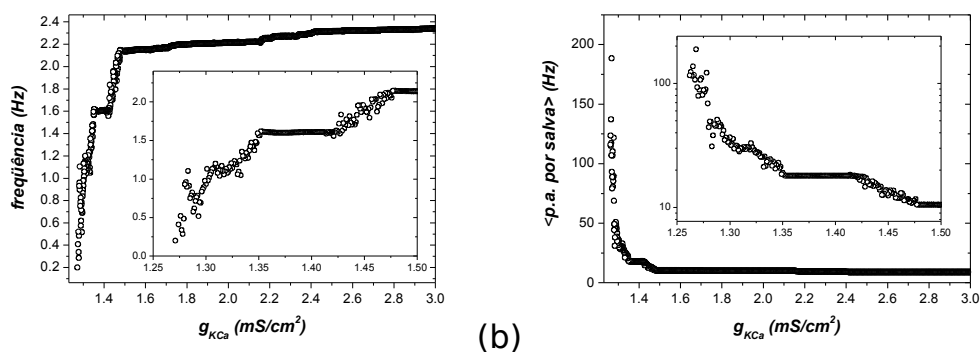


**Fig. 6.42: (esquerda) Freqüência de rajadas de um neurônio HR isolado em função do parâmetro  $I$ . É possível observar que a freqüência apresenta saltos que estão relacionados às sucessivas bifurcações de adição de períodos. (direita) Número médio de potenciais de ação por salva para a mesma faixa do parâmetro  $I$ . Para valores de  $I$  superiores a 3.17 o modelo apresenta comportamento tônico.**

Para o modelo HH2C e HHH, utilizamos como parâmetro de controle a condutância máxima dos canais de potássio dependentes de cálcio  $g_{KCa}$ . Por controlar uma corrente de potássio, o aumento de  $g_{KCa}$  tem o efeito médio de hiperpolarizar a célula. Desta forma, para valores maiores de  $g_{KCa}$  o neurônio dispara rajadas curtas e, para valores menores, rajadas longas e comportamento tônico são observados. Com exceção de quando o sistema está próximo à transição entre o comportamento tônico e em rajadas, este parâmetro não altera significativamente a duração das hiperpolarizações. As Fig. 6.43 e Fig. 6.44 mostram a freqüência de rajadas e o número médio de potenciais de ação em função de  $g_{KCa}$ . Estes modelos apresentam um decréscimo da freqüência quando estão próximos da transição de rajadas para tônico, causado pela diminuição da amplitude da hiperpolarização, de forma semelhante ao observado para o modelo de HR. Estes modelos, porém, apresentam um número muito maior de potenciais de ação a cada salva.



**Fig. 6.43: Diagramas do comportamento do modelo HH2C em função da condutância máxima dos canais de potássio dependentes de cálcio,  $g_{KCa}$ . (a) Número de potenciais de ação disparados a cada salva em escala logarítmica. (b) Frequência média com que o neurônio dispara rajadas de potenciais de ação. As barras de erros representam o desvio padrão das medidas de frequência. Para valores de  $g_{KCa}$  inferiores a 1.2 o modelo apresenta comportamento tônico.**



**Fig. 6.44: (a) Frequência e (b) número de potenciais de ação por salva do modelo HH1H. Os detalhes mostram uma ampliação da região próxima da transição de comportamento em rajadas para comportamento tônico. Para valores de  $g_{KCa}$  inferiores a 1.27 o modelo apresenta comportamento tônico.**

Uma ferramenta bastante útil para o estudo de sistemas dinâmicos e que utilizamos na análise dos modelos é o diagrama de

bifurcações. Este recurso, apesar de seu caráter visual, e conseqüentemente qualitativo, fornece um panorama do comportamento do sistema em função de um parâmetro de controle. Nesta tese, utilizamos os diagramas de bifurcações dos intervalos entre disparos (ISIs) para captar as principais características do comportamento dos modelos isolados. Estes diagramas mostram, em função do parâmetro de controle, os tempos decorridos entre um o  $n$ -ésimo e o  $(n+1)$ -ésimo potencial de ação, ou seja,  $ISI_n = T_{n+1} - T_n$ , onde  $T_n$  são os instantes em que o modelo dispara potenciais de ação após ter atingido um estado estacionário de comportamento. Observando os  $ISI_n$  em função do parâmetro que leva o modelo de um comportamento em rajadas para o comportamento tônico pode-se observar de que maneira a duração das rajadas ou o tempo de hiperpolarização, entre outras características, são modificados durante a transição.

Para o modelo de HR (veja seção de modelos de atividade neural) o parâmetro  $I$  leva o modelo de um comportamento em rajadas para tônico, conforme pode ser observado no diagrama de bifurcações da Fig. 6.45. Para valores de  $I$  pequenos (em torno de 2.0) o modelo de HR apresenta um comportamento em rajadas e, à medida que  $I$  aumenta, observam-se sucessivas transições, nas quais é acrescido um potencial de ação nas rajadas, o que é conhecido na literatura como rota de adição de período (Holden e Fan, 1992a, 1992b; Pisarchik *et al.*, 2001).

Nas transições (bifurcações de adição de período) para valores de  $I$  superiores a 2.8 observam-se faixas do parâmetro de controle onde os neurônios comportam-se irregularmente. Uma ampliação destas faixas é mostrada na Fig. 6.45b. Sabe-se que no modelo de HR o comportamento irregular observado corresponde a um comportamento caótico (Abarbanel *et al.*, 1996).

Aumentando ainda mais o parâmetro  $I$ , os intervalos onde se observa comportamento caótico vão ficando mais largos até uma seqüência final de bifurcações que levam ao comportamento tônico.

Para valores de  $I$  em torno de 3,2 podemos observar uma estrutura bastante comum em sistemas que apresentam caos, uma cascata de duplicações de período. A região onde esta cascata acontece é indicada pela seta na Fig. 6.45b. Para valores acima de 3,25 o sistema dispara potenciais de ação em intervalos (ISIs) iguais. Com a diminuição do parâmetro o modelo passa a apresentar ISIs de dois valores diferentes, passando pela primeira bifurcação. Diminuindo ainda mais o parâmetro o modelo apresenta um ciclo com quatro valores de ISIs, passando pela segunda bifurcação. Estas bifurcações acontecem sucessivamente, e o sistema passa a ter periodicidade  $2^k$  onde  $k$  é o número de bifurcações que o sistema sofreu. Após infinitas bifurcações, que se acumulam em um valor crítico do parâmetro  $I$ , o sistema se torna caótico.

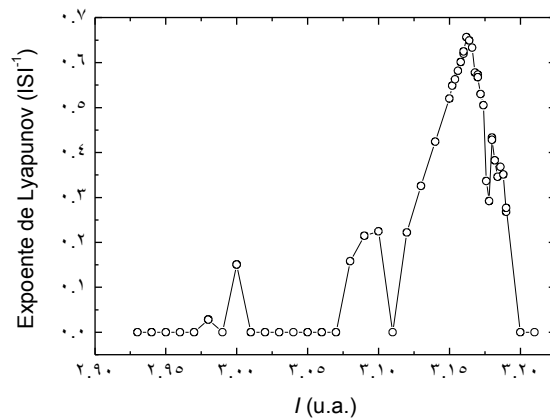
(a)(b)

**Fig. 6.45: Diagramas de bifurcações dos ISIs em função do parâmetro  $I$  para o modelo HR. Para  $I < \sim 3.0$  o número de potenciais de ação por rajada aumenta quando  $I$  aumenta. Para  $I > \sim 3.17$  o modelo apresenta comportamento tônico. A seta mostrada em (b) indica a região onde ocorrem sucessivas duplicações de período com a diminuição de  $I$ , formando uma rota de Feigenbaum para o caos.**

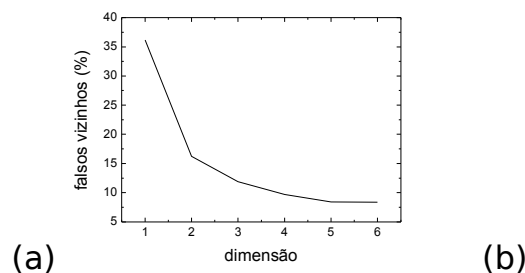
Para uma melhor caracterização da dinâmica caótica observada no modelo de HR, medimos o maior expoente de Lyapunov de algumas séries temporais para  $I$  entre 2,8 e 3,2. Estes resultados podem ser vistos na Fig. 6.46, e mostram que há um aumento do expoente em cada uma das faixas caóticas, indicando que as séries se tornam mais irregulares com o aumento de  $I$ . Como o sistema volta a ser regular após a transição para comportamento

tônico o expoente de Lyapunov volta a diminuir (assumindo valores negativos) para  $l > 3,16$ .

Para o cálculo dos expoentes de Lyapunov utilizamos reconstruções tri-dimensionais dos atratores através das coordenadas de atraso das séries de ISIs. Os mapas de retorno da Fig. 6.47 mostram estas reconstruções para duas e três dimensões.



**Fig. 6.46:** Alguns valores do maior expoente de Lyapunov das séries temporais do modelo HR para alguns valores de  $l$ . Cada uma das séries medidas encontra-se em uma das faixas caóticas observadas na Fig. 6.45b. Com o aumento do parâmetro  $l$  podemos observar um aumento do expoente de Lyapunov, indicando que as séries se tornam mais irregulares. Por conveniência, pusemos os valores do expoente das séries temporais periódicas iguais a zero.



**Fig. 6.47:** (a) Porcentagem de falsos vizinhos em função da dimensão de imersão para uma série de ISIs do modelo HR para  $l=3,15$ . Para três dimensões a maior parte dos falsos vizinhos é eliminada. (b) Mapa de retorno tri-dimensional para a mesma série de ISIs, mostrando a estrutura tri-dimensional do atrator reconstruído e suas projeções bi-dimensionais (em cores). A projeção em verde mostra o mapa de segundo retorno,  $ISI_n$  vs.  $ISI_{n+2}$ .



A Fig. 6.48 mostra o diagrama de bifurcações para o modelo HH2C. Nesta figura, podemos observar que existem ISIs de duas ordens de grandeza diferentes, os curtos que correspondem a intervalos entre disparos que ocorrem durante as rajadas e os longos, que correspondem aos intervalos entre o último disparo de uma rajada e o primeiro disparo da próxima. Referimo-nos aos curtos como ISIs intra-rajadas, e aos longos como inter-rajadas.

É possível observar que para valores grandes de  $g_{KCa}$  o sistema apresenta hiperpolarizações com duração em torno de 1100ms, o que pode ser notado pelos ISIs inter-rajadas. Este comportamento não é muito alterado quando o parâmetro é diminuído, com a exceção de uma faixa estreita em torno de  $g_{KCa} \approx 1.,25$ . Este modelo também passa por uma seqüência de bifurcações de adição de período, porém, diferentemente do observado para o modelo de HR, a adição de potenciais de ação ocorre quando o parâmetro é diminuído, ou seja, a seqüência de bifurcações acontece no sentido contrário.

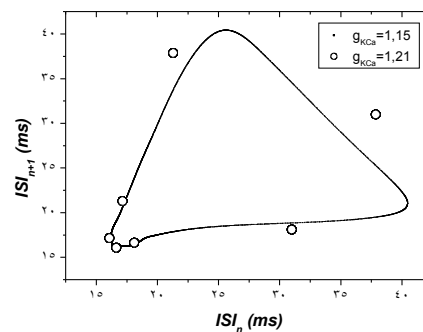
(a)(b)

(c)

**Fig. 6.48: (a) Diagrama de bifurcações para o modelo HH2C. (b) Ampliação da região de transição com uma quebra no eixo vertical, permitindo uma observação mais detalhada da dinâmica dos ISIs das rajadas, bem como dos ISIs correspondentes às hiperpolarizações. (c) Ampliação da região de comportamento caótico, também com quebra nos eixos. Diversas faixas de parâmetros onde o sistema é caótico são estreitas, separadas por janelas periódicas.**

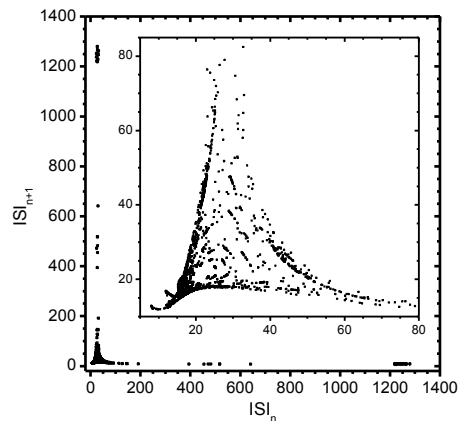
Para  $g_{KCa} \approx 1.213$  o modelo passa por uma bifurcação na qual, para valores inferiores do parâmetro, apresenta comportamento tônico periódico e para valores superiores, comportamento em rajadas e caótico. A órbita periódica apresentada pelo modelo próximo à bifurcação pode ser vista na Fig. 6.49. Para  $g_{KCa} < 1,162$ , observa-se uma distribuição aparentemente contínua dos ISIs no diagrama de bifurcações. Este comportamento está ligado a uma

dinâmica quase-periódica oriunda de uma relação incomensurável entre as frequências de duas oscilações, uma da modulação do platô que sustenta os potenciais de ação e a outra que define a taxa de disparo. Assim, a reconstrução do atrator por coordenadas de atraso se assemelha a uma linha fechada (Fig. 6.49). Assim, observamos que o comportamento periódico que é apresentado para valores de  $g_{KCa}$  imediatamente inferiores à passagem para comportamento tônico ocorre devido a um travamento de frequências do ciclo limite mostrado na Fig. 6.49.



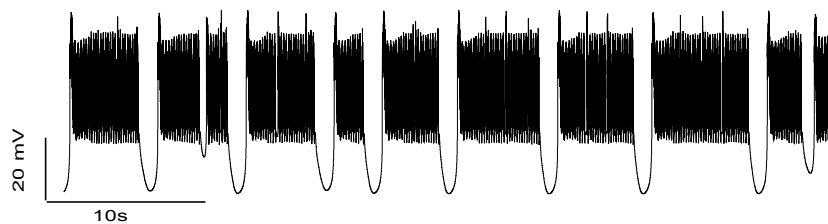
**Fig. 6.49: Mapa de retorno do modelo HH2C. Os círculos abertos mostram a órbita periódica observada para  $g_{KCa}=1,21$ . Os pontos cheios mostram o comportamento quase-periódico proveniente de uma relação incomensurável entre a frequência de modulação do platô e a frequência de disparos de potenciais de ação.**

O modelo HH2C apresenta comportamento irregular para algumas regiões do parâmetro  $g_{KCa}$ . Evidências do comportamento irregular podem ser observadas tanto no diagrama de bifurcações como também no mapa de retorno dos ISIs, mostrado na Fig. 6.50. Esta figura mostra também um detalhe da dinâmica dos ISIs intra-rajadas, que exhibe com maior detalhe a estrutura do atrator dinâmico. O maior expoente do espectro de Lyapunov calculado para esta série é de  $0,12 \pm 0,01$ , que evidencia a presença de comportamento caótico.



**Fig. 6.50:** Mapa de retorno para o modelo HH2C para  $g_{KCa}=1.221$ . Os pontos próximos de zero representam os ISIs intra-salva e os pontos mais distantes os inter-salva. O detalhe mostra uma ampliação da dinâmica dos ISIs inter-salva. Estes dados foram obtidos com um passo de integração que garante um erro no potencial de membrana inferior a  $10^{-10}$  mV a cada passo, mostrando que o comportamento irregular existe mesmo quando os erros de integração são diminuídos.

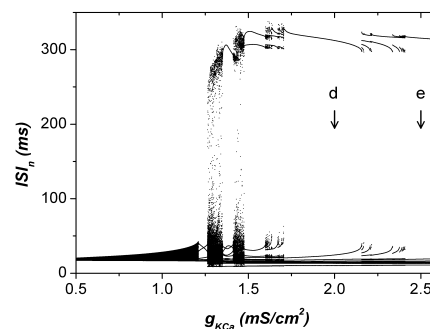
Uma característica bastante marcante deste modelo é o fato de apresentar hiperpolarizações bastante estereotipadas, ou seja, mesmo quando o modelo se comporta irregularmente, existe uma predominância de hiperpolarizações de duração aproximada de  $1250$  ms sobre as de menor duração. A Fig. 6.51 mostra um trecho da série temporal utilizada para construir o mapa de retorno da Fig. 6.50, e que evidencia este comportamento.



**Fig. 6.51:** Série temporal mostrando as irregularidades nas durações das rajadas dos potenciais de ação e na amplitude das hiperpolarizações para  $g_{KCa} = 1.221$ . Apesar de ocorrerem hiperpolarizações com diversas durações, as de duração aproximada de  $1250$  ms são muito mais observadas do que as mais curtas.

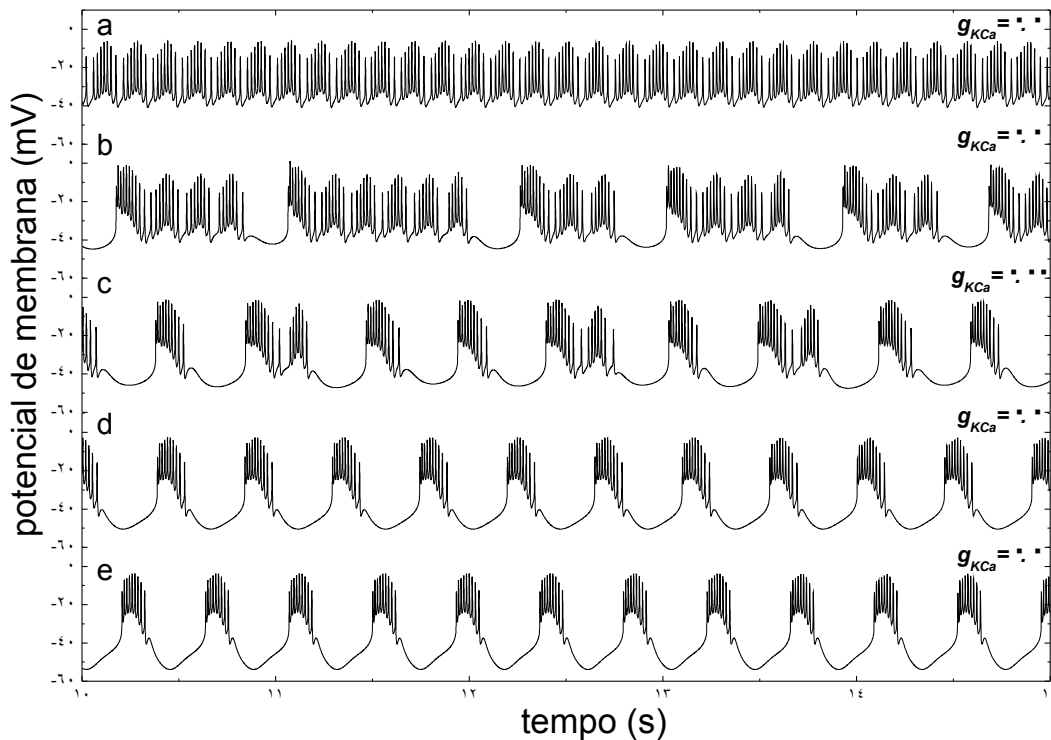
As modificações na corrente de hiperpolarização  $I_H$  feitas no modelo HH2C e que deram origem ao modelo HHIH fazem com que diversas características do comportamento do modelo sejam alteradas e, conseqüentemente, o mesmo ocorre com o diagrama de bifurcações, conforme pode ser observado na Fig. 6.52. Este diagrama mostra que a duração média das hiperpolarizações em relação ao modelo original é bem menor, de aproximadamente 300 ms. Este efeito pode ser observado também nas séries temporais mostradas na Fig. 6.53.

Esta potencialização de  $I_H$  não altera muito a região em que o modelo passa pela transição para o comportamento tônico, que permanece em torno de  $1,3 \text{ mS/cm}^2$ . Este fato está relacionado com a ativação de  $I_H$  acontecer somente para valores bem baixos do potencial de membrana, enquanto o parâmetro  $g_{KCa}$  introduz modificações que são importantes na determinação da duração das rajadas, ou seja, quando o neurônio está despolarizado.

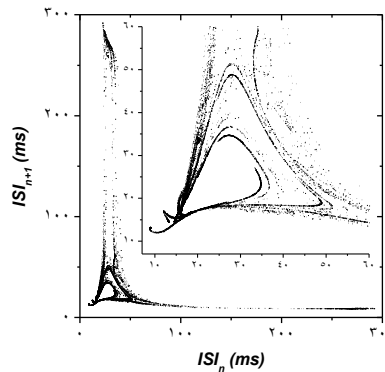


**Fig. 6.52: (esquerda) Diagrama de bifurcações para o modelo de HHIH. (direita) Ampliação mostrando a faixa de parâmetros próxima da transição para comportamento tônico. A quebra do eixo vertical permite observar tanto o comportamento dos ISIs intra-salva como os correspondentes às hiperpolarizações (inter-salva). As letras representam os valores de  $g_{KCa}$  das séries temporais da Fig. 6.53.**

A Fig. 6.54 mostra o mapa de retorno para  $g_{KCa}=1,3$ , mostrando o comportamento caótico do modelo. O expoente de Lyapunov obtido para esta série temporal é  $0,140 \pm 0,004$ .



**Fig. 6.53:** Algumas séries temporais do modelo HHH. A letra de cada série temporal identifica sua localização no diagrama de bifurcações da Fig. 6.52.



**Fig. 6.54:** Mapa de retorno dos ISIs para o modelo de HHH. O detalhe mostra uma ampliação em torno de 35 ms, onde ocorre a dinâmica dos potenciais de ação dentro de uma mesma salva. A figura mostra evidências de um comportamento caótico.

Com os dados mostrados nesta seção, temos um panorama do comportamento intrínseco de alguns modelos de atividade neural. Estes mesmos modelos são utilizados, nas seções seguintes, para formar pequenas redes neurais na tentativa de observar quais são

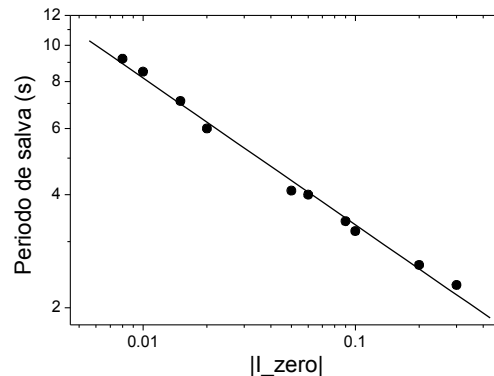
as características individuais necessárias para obtenção de redes neurais estáveis e flexíveis.

## **6.2. Acoplamentos de dois neurônios**

### **6.2.1. Redes com o modelo SN**

Ao conectarmos dois neurônios modelo SN com mútua inibição é produzido um comportamento oscilatório em antifase, com os neurônios disparando rajadas de potenciais de ação alternadamente. A Fig. 6.55 mostra esta oscilação, onde os dois neurônios são intrinsecamente silenciosos e disparam uma rajada ao serem liberados da inibição sináptica. No caso mostrado, o neurônio que sofre a inibição não dispara enquanto o neurônio ativo não termina a rajada. Isto mostra que se controlarmos a duração da rajada através de algum parâmetro, podemos modificar bastante a frequência de oscilação dos neurônios. Para evidenciar isto, na Fig. 6.56 mostramos o gráfico do período da oscilação de um par de neurônios SN em função de uma corrente externa  $I_{zero}$  injetada nos dois neurônios. Os neurônios oscilam com períodos extremamente grandes para determinados valores de  $I_{zero}$ , de acordo com uma lei de escala.

**Fig. 6.55: Dois neurônios SN acoplados e mantendo um comportamento em antifase. Pode-se observar que quando o neurônio dispara logo depois de ser inibido a taxa com que ele dispara potenciais de ação é maior devido ao rebote pós-inibitório. Além disto, o neurônio dispara uma única rajada e retorna ao potencial de repouso, momento no qual o outro neurônio é liberado e inicia a sua rajada. O aumento da duração das rajadas permite que os dois neurônios oscilem com frequências bastante baixas.**



**Fig. 6.56: Período de rajadas de dois neurônios SN em função do parâmetro  $I_{zero}$ , em escala log-log, mostrando uma relação do tipo lei de escala. A frequência pode ser modificada em até cinco vezes, evidenciando a grande flexibilidade desta rede.**

### 6.2.2.Redes com o modelo HR

Para o modelo HR, os espaços de parâmetros da frequência com que os neurônios disparam as rajadas e do número médio de potenciais de ação por salva são mostrados na Fig. 6.58. Neste modelo, o parâmetro utilizado para determinar o comportamento intrínseco do neurônio é a corrente  $I$  (seção 6.1).

Na Fig. 6.58a podemos observar que, para valores de  $I$  próximos de 2.0, a variação da frequência em função de  $g_{sin}$  é bastante pequena, indo de aproximadamente 1.8 Hz, para condutâncias baixas, a 1.4 Hz para condutâncias altas. No entanto, ao tomarmos valores superiores de  $I$ , a variação da frequência é aumentada consideravelmente. Para valores próximos de 4.0, observa-se uma faixa de frequências que vai de 0.6 a 2.2 Hz, ou seja, uma variação superior a 3 vezes, similar ao observado em experimentos com o CPG biológico.

Estes resultados mostram que as redes formadas por neurônios cujo comportamento intrínseco é tônico são mais flexíveis, pois são mais suscetíveis à modulação sináptica. A Fig. 6.57 contém duas séries temporais que mostram a variação da frequência de oscilação dos neurônios.

A Fig. 6.58b mostra o espaço de parâmetros do número médio de potenciais de ação por rajada. De maneira geral, as mudanças nesta medida se modificam de maneira inversa à medida de frequência, ou seja, o aumento do número de potenciais de ação faz com que o ciclo total da rede fique mais longo para “acomodar” o novo potencial de ação, implicando em uma diminuição da frequência. A exceção acontece na região em vermelho da Fig. 6.58a onde o aumento da frequência não corresponde a uma diminuição do número de potenciais de ação por salva.

Para identificarmos a estabilidade das séries temporais dos neurônios acoplados, calculamos o desvio padrão das medidas de frequência. Esta medida é capaz de revelar quais são as regiões do espaço de parâmetros que apresentam maior variabilidade na duração dos seus ciclos, indicando os possíveis acoplamentos instáveis. Séries temporais que possuem um desvio padrão da frequência alto, possuem uma grande variabilidade nos períodos de rajadas e, conseqüentemente, são mais instáveis.

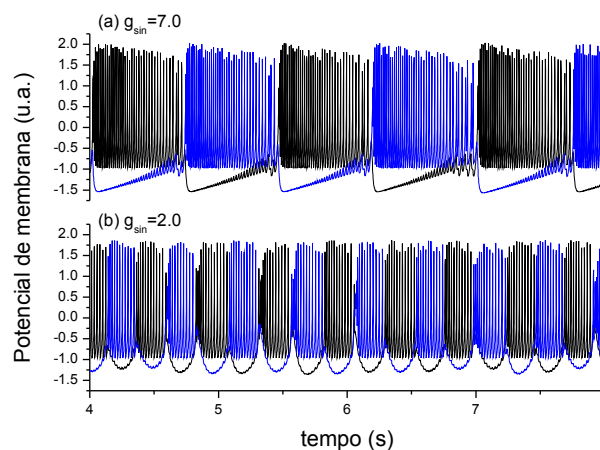
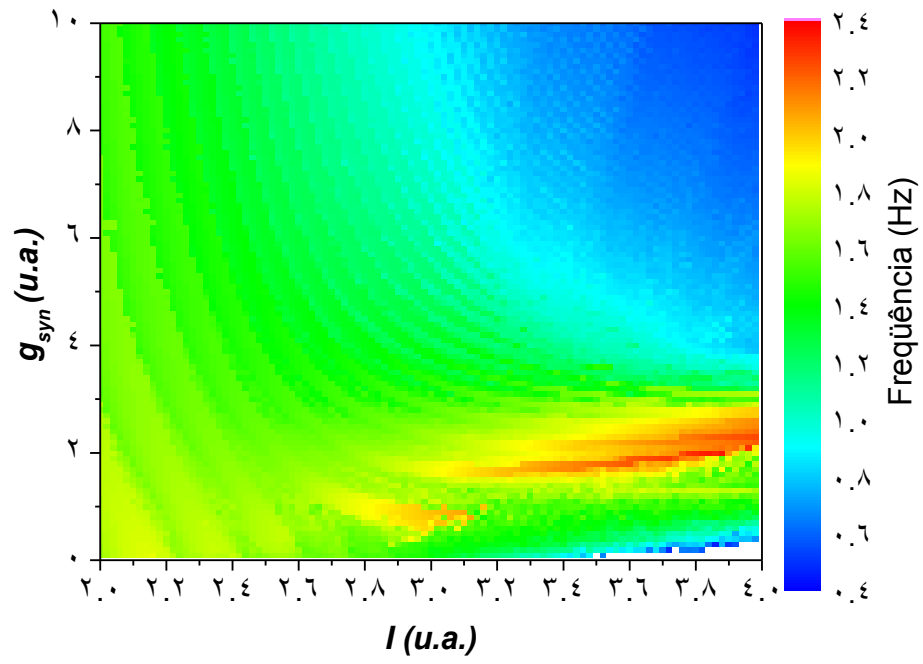


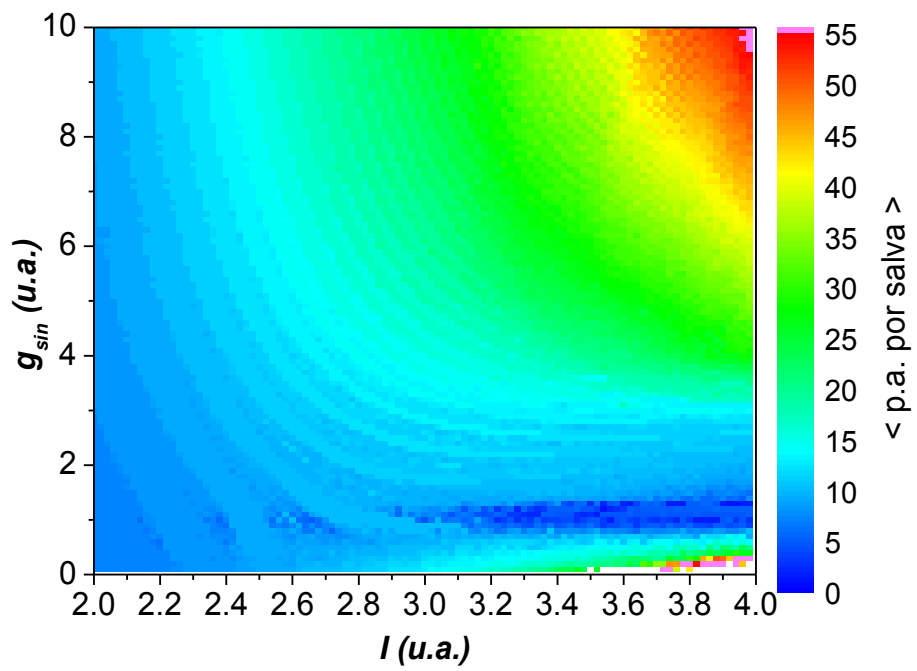
Fig. 6.57: Duas séries temporais de neurônios acoplados executando oscilações em antifase. Em ambas as séries os neurônios têm comportamento individual tônico ( $I=3,8$ ) e, em (a) a condutância sináptica  $g_{sin} = 7,0$  e em (b)  $g_{sin} = 2,0$ . A frequência da rede varia de 2,3 Hz (b) a 0,67 Hz (a) com a modificação da condutância sináptica. Outro efeito que pode ser observado em (a)



é que a taxa de disparo é grande no início e diminui ao longo da rajada. Este efeito está ligado ao forte rebote pós-inibitório apresentado pelo modelo.



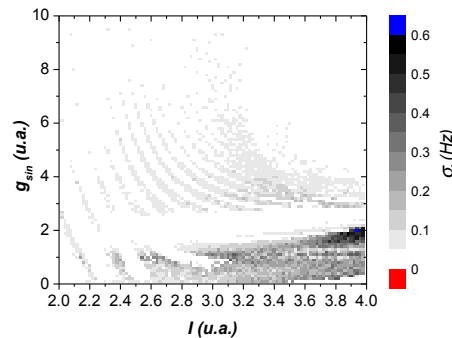
(a)



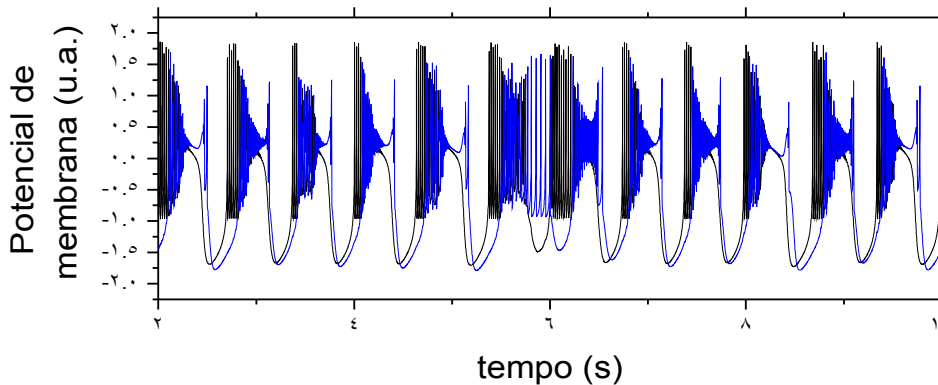
(b)

**Fig. 6.58: Espaço de parâmetros (a) da frequência e (b) do número médio de potenciais de ação por salva para o modelo HR. Para a maior parte dos parâmetros, a dependência das duas grandezas é similar, significando que a diminuição da frequência de oscilação dos neurônios está associada a aumentos do número de potenciais de ação a cada rajada. Na região em vermelho em (a), no entanto, existe um aumento da frequência que não tem uma diminuição correspondente do número de potenciais de ação por salva. Este efeito está associado ao rebote pós-inibitório que o modelo apresenta.**

A Fig. 6.59 mostra o espaço de parâmetros do desvio padrão da frequência  $\sigma_f$ . As faixas claras descendentes na região de  $g_{sin} > 2,0$  representam as séries temporais que estão próximas de bifurcações de adição de período e cujas rajadas oscilam entre  $n$  e  $n+1$  potenciais de ação, resultando em um desvio padrão superior aos das séries com rajadas regulares. Apesar de irregulares, as séries temporais que se encontram nestas transições, apresentam um comportamento temporal adequado ao funcionamento de uma rede, pois representam variações muito pequenas nos períodos de rajadas. Nas regiões mais escuras da Fig. 6.59, por outro lado, a atividade temporal que os neurônios desempenham é bastante irregular, e não podem ser consideradas adequadas ao funcionamento de uma rede. A Fig. 6.60 mostra uma série temporal deste tipo. Desta forma, existe uma faixa grande de parâmetros que não produzem uma atividade satisfatória e, além disto, esta faixa aumenta com o aumento de  $I$ , ou seja, quanto maior o valor de  $I$  menor é a faixa de  $g_{sin}$  cujas séries temporais são estáveis e maior é o valor mínimo de  $g_{sin}$  necessário para obter atividade regular.



**Fig. 6.59: Desvio padrão da frequência em função dos parâmetros de controle. É possível observar uma área próxima ao canto inferior direito na qual as séries temporais são mais instáveis.**

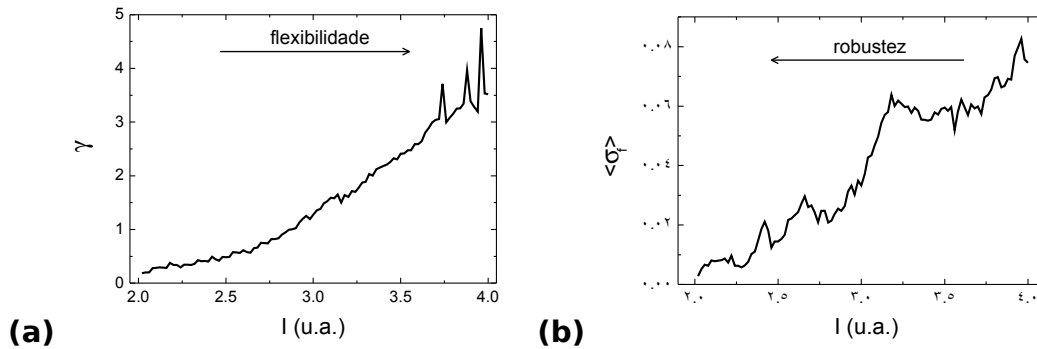


**Fig. 6.60: Exemplo de série temporal de neurônios acoplados onde o comportamento é instável, ou seja, os neurônios não estabelecem um comportamento em antifase e não apresentam um ritmo periódico. Neste caso os dois neurônios apresentam comportamento tônico quando isolados ( $I=3,8$  e  $g_{sin}=1,0$ ).**

Para quantificarmos melhor a flexibilidade apresentada pela rede, podemos definir uma grandeza

$$\gamma = \frac{f_{\max} - f_{\min}}{f_{\min}}$$

onde  $f_{\max}$  ( $f_{\min}$ ) é a frequência máxima (mínima) que os neurônios atingem em toda a faixa de  $g_{sin}$ . Este fator significa o quanto a rede varia a sua frequência normalizado pela frequência mínima que a rede alcança (Fig. 6.61a).



**Fig. 6.61: (a) Fator  $\gamma$  em função de  $I$  mostrando que a flexibilidade da rede aumenta com o valor de  $I$ . (b) Média do desvio padrão da frequência feita para todos os valores de  $g_{sin}$  em função de  $I$ . Com o aumento do parâmetro, as séries se tornam mais instáveis, diminuindo a robustez do padrão rítmico da rede.**

Quantificamos a robustez das séries temporais introduzindo uma outra grandeza, da seguinte maneira: o espaço de parâmetros do desvio padrão da frequência (Fig. 6.59) pode ser representado como uma matriz, onde cada elemento corresponde ao desvio padrão da frequência das séries temporais obtidas com os parâmetros  $I$  e  $g_{sin}$ , que podem ser tomados como os índices da matriz. Assim, temos a matriz definida pelos elementos

$$\sigma_f[I^i, g_{sin}^j],$$

onde  $I^i = I_{\min} + i \Delta I$ ,  $\Delta I = \frac{I_{\max} - I_{\min}}{M}$ ,  $i = 0 \dots M$  são os diversos valores do parâmetro que controla o comportamento intrínseco e

$$g_{sin}^j = g_{\min} + j \Delta g, \quad \Delta g = \frac{g_{\max} - g_{\min}}{N}, \quad j = 0 \dots N, \quad \text{são os valores do}$$

acoplamento sináptico. Assim, definimos a média

$$\langle \sigma_f \rangle(I^i) = \sum_{j=0}^N \sigma_f[I^i, g_{sin}^j].$$

O significado desta grandeza é o quanto em média as séries são irregulares para cada valor de  $I$ , e é um indicador da robustez das séries temporais. Quanto maior o valor desta média, mais

instáveis as séries temporais são. Conforme observamos na (Fig. 6.61b), quanto maior o valor de  $I$ , maior é o valor de  $\langle \sigma_f \rangle$ , mostrando que a instabilidade das séries aumenta com o valor de  $I$  e que as séries são mais robustas para valores menores de  $I$ .

Observamos, então, uma compensação entre dois fatores, a flexibilidade e a robustez da rede. Aumentando o parâmetro  $I$ , a flexibilidade aumenta, e diminuindo o mesmo parâmetro, a robustez aumenta. Quanto mais tônicos são os neurônios componentes da rede, maior é a sua flexibilidade, mas simultaneamente a sua robustez diminui.

Interpretamos os resultados acima da seguinte maneira: quando os neurônios apresentam um comportamento em rajadas, a duração das rajadas é semelhante à das hiperpolarizações. Sendo os neurônios idênticos e as sinapses inibitórias, os neurônios simplesmente ajustam suas fases durante um período transiente e passam a oscilar em oposição de fase. Neste caso praticamente não há competição, quando um neurônio é inibido ele já está hiperpolarizado (ou próximo disto), o que faz com que a corrente sináptica seja pequena. Naturalmente estas séries temporais são bastante estáveis, mesmo para condutâncias sinápticas muito pequenas. Quando aumentamos a intensidade da condutância sináptica, observamos apenas uma pequena mudança da frequência da rede, devido ao rebote pós-inibitório que faz com que o neurônio dispare mais fortemente quando cessa a inibição. Como já observamos anteriormente, quando a corrente inibitória é pequena, o rebote pós-inibitório é fraco.

Por outro lado, quando os neurônios estão tônicos não é possível estabelecer um comportamento em antifase para condutâncias sinápticas baixas, pois a corrente inibitória é insuficiente para fazer com que os neurônios hiperpolarizem. Isto mostra a razão de observarmos séries temporais instáveis no

espaço de parâmetros nestas condições. Quando a corrente sináptica passa a ser suficiente para hiperpolarizar o neurônio, observamos séries temporais de alta frequência, nas quais os neurônios hiperpolarizam durante um período curto e voltam a disparar. Aumentando a condutância sináptica, passam a ocorrer hiperpolarizações mais longas, devido às correntes inibitórias maiores, causando uma diminuição da frequência de oscilação. Esta diminuição é agravada pelo aumento da taxa de disparo após a inibição sináptica que o modelo HR apresenta quando os neurônios possuem comportamento tônico. Isto faz com que a corrente inibitória seja maior e contribui para que o tempo do ciclo total de oscilação diminua. Este efeito pode ser observado na Fig. 6.57, onde é possível notar a mudança da taxa de disparo logo após uma inibição sináptica forte.

Baseados nestas observações, argumentamos que a rede com o balanço mais adequado entre flexibilidade e robustez deve ser composta por neurônios cujo comportamento intrínseco está numa região intermediária entre o comportamento em rajadas e o tônico. É interessante notar que é justamente nesta transição onde há uma grande probabilidade de observarmos comportamento caótico, pois o sistema encontra-se próximo da bifurcação entre dois comportamentos cujas escalas de tempos predominantes são bastante diferentes.

Acreditamos que os argumentos apresentados acima são válidos também para neurônios biológicos, uma vez que o modelo HR capta as principais características observadas em experimentos com neurônios isolados. Além disto, obtivemos dados experimentais com redes híbridas que suportam fortemente estas observações (seção 7.1.1).

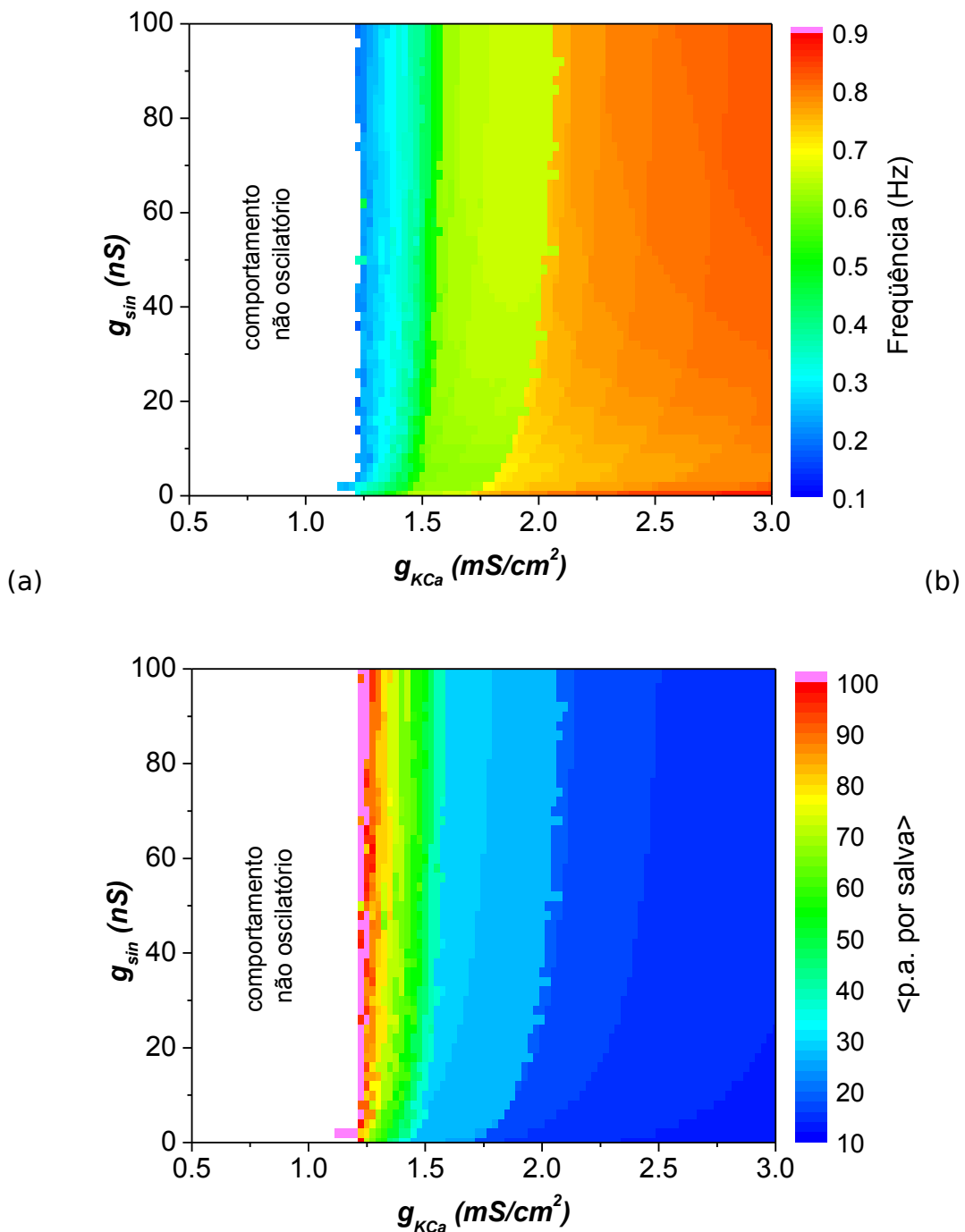
### 6.2.3. Redes com o modelo HH2C

Os espaços de parâmetros da frequência e do número médio de potenciais de ação por rajada para redes de dois neurônios do tipo HH2C são mostrados na Fig. 6.62a e b, respectivamente. Para este modelo observamos um comportamento bastante diverso do observado com o modelo de HR, principalmente com relação à frequência de rajadas, que quase não se altera com a modificação da condutância sináptica. O espaço de parâmetros para o número médio de potenciais de ação (Fig. 6.62b) exibe um comportamento similar ao da frequência, ou seja, as mudanças da frequência têm uma relação direta com mudanças no número de potenciais de ação das rajadas, fato observado também para o modelo HR.

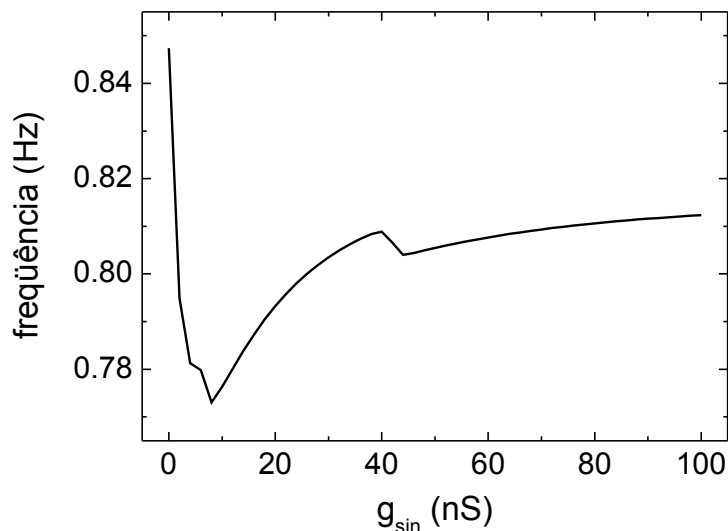
Para o modelo HH2C, a dependência da frequência de rajadas em função de  $g_{sin}$  é contrária à obtida com o modelo de HR, e à observada em dados experimentais, como pode ser observado na Fig. 6.63.

Outro fato que torna os espaços de parâmetros do modelo HH2C diferentes dos do modelo HR é que, quando o comportamento individual dos neurônios está próximo de se tornar tônico, apresentando rajadas longas, os neurônios deixam de oscilar em antifase. Este comportamento é representado na Fig. 6.62 pelas regiões de cor branca. Nestas regiões, quando um neurônio dispara, o outro é inibido permanentemente, não disparando potenciais de ação. Isto significa que o neurônio que é inibido não tem um rebote forte suficiente para vencer a inibição e voltar a disparar. Essa deficiência nos inspirou a propor alterações no modelo conforme descrevemos na seção 5.1.4.





**Fig. 6.62:** (a) Freqüência e (b) número médio de potenciais de ação por salva em função dos parâmetros  $g_{sin}$  e  $g_{KCa}$  para o modelo HH2C. Podemos observar que o comportamento deste sistema é pouco flexível, a freqüência é pouco modificada com a mudança da condutância sináptica. As grandezas exibidas nos dois gráficos têm comportamentos similares, mostrando que a variação da freqüência está diretamente associada com mudanças no número de potenciais de ação nas rajadas.

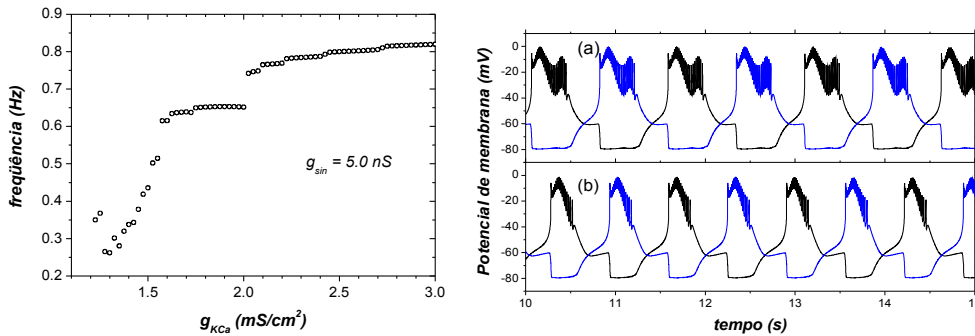


**Fig. 6.63: Frequência de rajadas para  $g_{KCa}=2,5 \text{ mS/cm}^2$  mostrando que a frequência de rajadas aumenta com a condutância sináptica após uma queda inicial. Este comportamento, diferente do observado para o modelo HR, não é observado em experimentos.**

Em ambos os gráficos da Fig. 6.62 podemos observar uma mudança abrupta da frequência em torno de  $g_{KCa} = 2,0 \text{ mS/cm}^2$  (Fig. 6.64). Este salto de frequência está ligado a oscilações das correntes lentas de cálcio que sustentam o platô de potencial durante as rajadas. Assim, para  $g_{KCa} \approx 2,0$  a salva apresenta uma oscilação a mais que para 2,2 e ocasionando o salto na frequência de oscilação dos neurônios. As duas séries temporais mostradas na Fig. 6.64 ilustram este efeito.

Nas séries temporais da Fig. 6.64, quando um neurônio está ativo, ou seja, durante a sua salva, o potencial de membrana do outro neurônio permanece praticamente no valor do potencial reverso sináptico  $V_{\text{rev}}=-80 \text{ mV}$ . Este comportamento não corresponde ao observado em dados experimentais, onde se observam fortes correntes despolarizantes quando o potencial de membrana atinge valores equivalentemente baixos (veja seção de resultados experimentais). Este rebote fraco está fortemente

relacionado à grande área do espaço de parâmetros onde a rede não desempenha comportamento oscilatório.



**Fig. 6.64:** (esquerda) Frequência de rajadas em função de  $g_{KCa}$  para  $g_{sin}=5.0$  nS, mostrando o salto na frequência em torno de  $g_{KCa}=2,0$ . (direita) Duas séries temporais para (a)  $g_{KCa} = 1,9$  e (b)  $g_{KCa} = 2,2$  mS/cm<sup>2</sup>. Em (a) pode-se observar que o platô responsável pela rajada de potenciais de ação sofre uma oscilação antes de hiperpolarizar, fato que não ocorre em (b) e que ocasiona o salto na frequência de salva.

Estas duas características marcantes dos espaços de parâmetros para o modelo HH2C mostram que o modelo, apesar do grande apelo eletrofisiológico, não é capaz de compor uma rede que gere oscilações estáveis e não é suficientemente flexível para responder de forma eficiente à ação de neuromoduladores.

Os resultados obtidos até o momento mostram uma diferença bastante nítida entre os modelos HH2C e HR quanto ao estabelecimento de um padrão oscilatório em antifase. Uma das diferenças mais explícitas é a de que o modelo HR apresenta um comportamento estável, oscilatório e em antifase mesmo quando o comportamento individual dos neurônios é tônico, o que mostra que um neurônio é capaz de vencer a inibição exercida pelo neurônio ativo e passar a disparar potenciais de ação. Este comportamento não é observado no modelo HH2C o que revela um ponto fraco do modelo, visto que existem evidências experimentais bastante fortes de que neurônios do circuito pilórico apresentam um forte rebote quando hiperpolarizados. Isto faz com que a rede apresente um comportamento que não é robusto quando o modelo se encontra na

transição entre comportamento tônico e em rajadas, pois qualquer modificação nos parâmetros pode fazer com que um dos neurônios pare de disparar e que o ritmo cesse.

Acreditamos que a inadequação do modelo HH2C quanto à descrição do comportamento coletivo esteja relacionada principalmente aos seguintes fatores: O primeiro vem do fato de que o modelo foi baseado em dados experimentais de neurônios em cultura (Turrigiano *et al.*, 1995), e ainda, sofreu diversas modificações (Liu *et al.*, 1998; Prinz *et al.*, 2003a). Como exemplo, a corrente de hiperpolarização  $I_H$  foi retirada de neurônios do tálamo (Huguenard e McCormick, 1992). O segundo é que o desenvolvimento do modelo, através do ajuste de alguns parâmetros, foi feito no sentido de reproduzir o comportamento de neurônios isolados e, portanto, não houve a preocupação em modelar os possíveis comportamentos coletivos que o modelo poderia gerar.

#### **6.2.4. Redes com o modelo HHH**

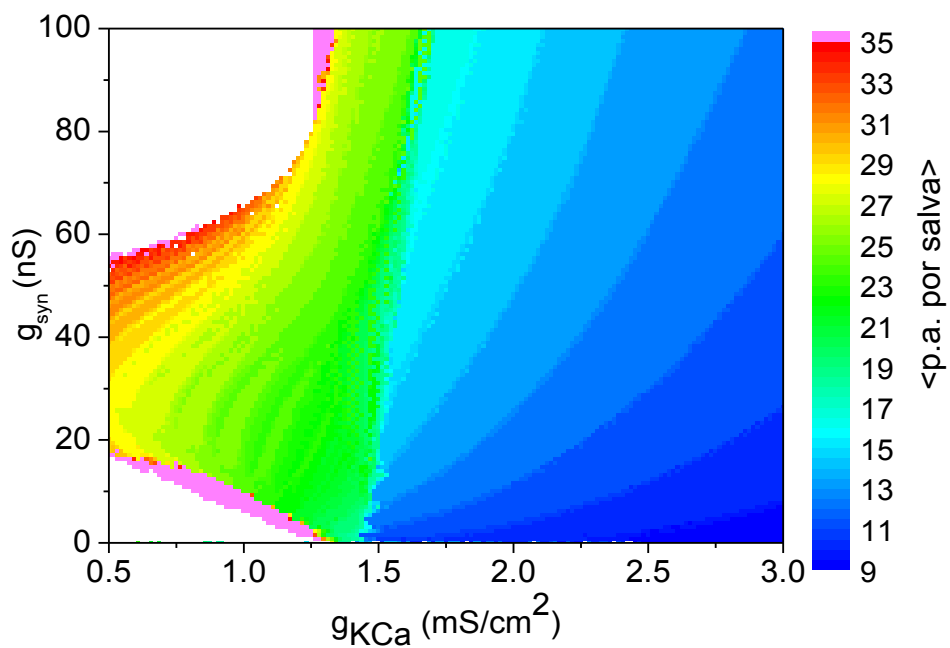
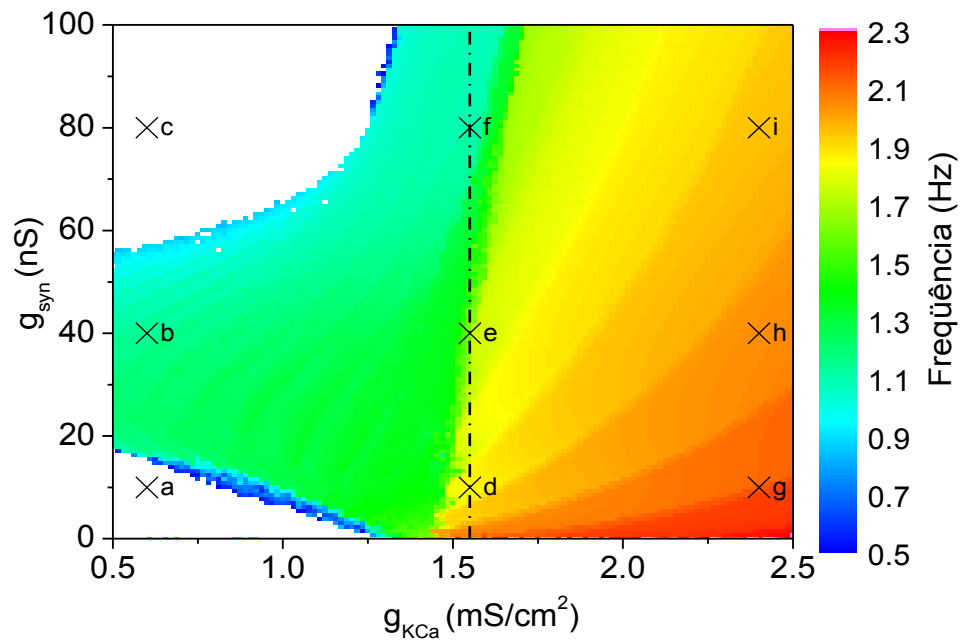
É inegável, apesar dos problemas relativos ao comportamento coletivo, que o modelo HH2C descreve adequadamente muitas das características individuais dos neurônios do circuito pilórico. Assim, naturalmente surge a pergunta: existiria alguma pequena modificação que poderia ser feita para que o modelo reproduzisse o comportamento coletivo de maneira mais eficiente sem grandes modificações do seu comportamento intrínseco? Se sim, qual é ela? Indícios da resposta podem ser encontrados no trabalho de Sharp *et al.*, 1996, onde a adição de uma corrente ativada por hiperpolarização  $I_H$  permitiu estabelecer um comportamento do tipo oscilador de meio-centro entre dois neurônios do circuito gástrico que sequer apresentavam comportamento em rajadas quando isolados. Além disto, diversos trabalhos tentam mostrar a

importância da corrente  $I_H$  na regularização de diversos processos neurais (Zhang *et al.*, 2003; Golowasch e Marder, 1992; Kiehn e Harris-Warrick, 1992).

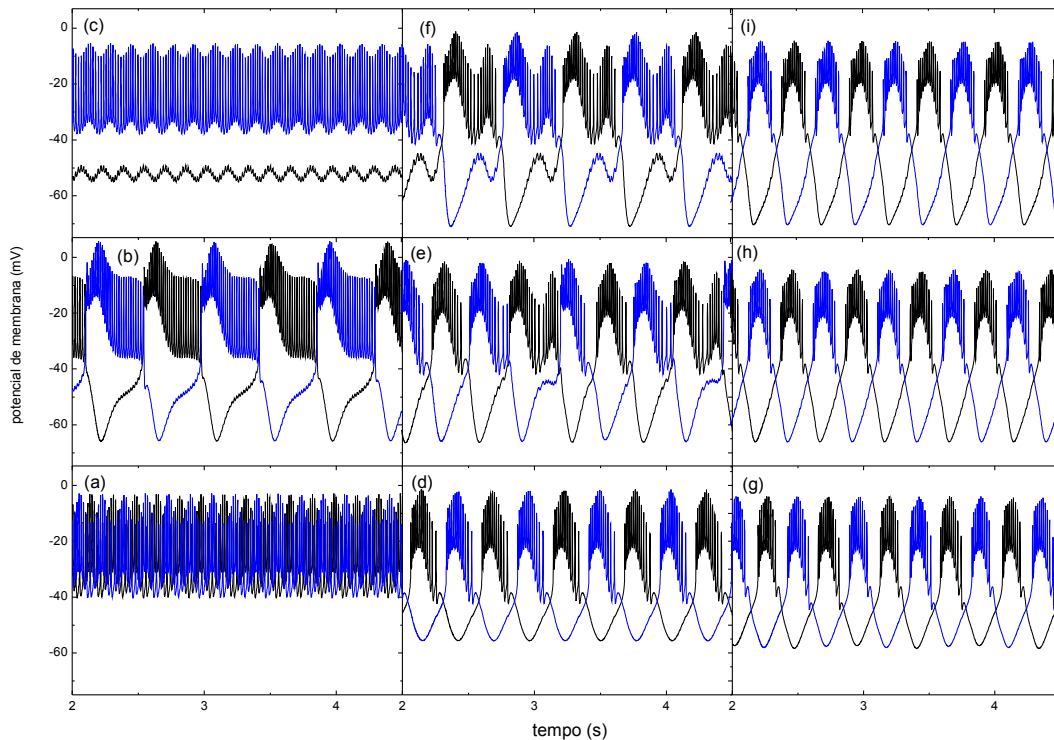
Analizamos os efeitos da potencialização desta corrente para o modelo HH2C. As alterações feitas nas equações que regulam a corrente  $I_H$  para a elaboração do modelo HHIH são descritas detalhadamente na seção 5.1.4, e consistem num aumento da condutância desta corrente e na alteração de sua curva de ativação, fazendo com que ela se ative para valores maiores do potencial de membrana. Os espaços de parâmetros para o modelo HHIH são mostrados na Fig. 6.65.

A forma com que a rede responde à mudança dos parâmetros se modifica completamente em relação ao modelo HH2C. A dependência da frequência em relação a  $g_{sin}$  é muito maior e concorda com o observado experimentalmente, ou seja, a frequência diminui com o aumento da condutância sináptica. Os neurônios apresentam um comportamento em oposição de fase em uma faixa bem maior do espaço de parâmetros, incluindo valores de  $g_{KCa} < 1.2 \text{ mS/cm}^2$ , o que corresponde em sua maioria a neurônios tônicos. Para a maior parte desta nova região, os neurônios estão tônicos. Portanto, a modificação da corrente  $I_H$  forneceu aos neurônios a capacidade de vencer a inibição sináptica e iniciar rajadas. Esta capacidade é fundamental para o estabelecimento do ritmo oscilatório, já que os neurônios não apresentam hiperpolarizações.

A faixa de frequências que a rede percorre também é muito superior que a observada para o modelo HH2C, indo de 0,9 a 2,1 Hz. Esta faixa ainda não é muito grande se comparada com o modelo HR, porém representa um aumento bastante significativo em relação ao modelo HH2C.



**Fig. 6.65:** (a) Espaço de parâmetros de frequência de rajadas para o modelo HHIH. Podemos observar uma nova grande área colorida mostrando que o modelo apresenta oscilações em antifase para uma área muito maior do que sem a adição de Ih. Os pontos representados pelas cruzes (identificados pela letra à direita do ponto) mostram alguns parâmetros cujas séries temporais são mostradas na Fig. 6.66. (b) Número médio de potenciais de ação por salva, que varia proporcionalmente à frequência de rajadas.



**Fig. 6.66:** Séries temporais obtidas com os parâmetros representados por cruzes na Fig. 6.65 e identificados por letras. Para  $g_{KCa} = 0,60 \text{ mS/cm}^2$  (a, b e c), somente valores intermediários da condutância sináptica apresentam comportamento oscilatório. Para  $g_{KCa} = 1,55 \text{ mS/cm}^2$  (d, e e f) observa-se uma grande variação da frequência ao mudarmos o valor da condutância sináptica. Para  $g_{KCa} = 2,4 \text{ mS/cm}^2$ , praticamente não há modificação na frequência quando a condutância sináptica é alterada.

Na Fig. 6.66 são mostradas algumas séries temporais dos neurônios acoplados. O comportamento dos neurônios durante a inibição sináptica é bastante diferente em relação ao observado no modelo HH2C. A diferença está no forte rebote que ocorre logo após o início da aplicação da corrente inibitória. Diferentemente do que acontece na Fig. 6.64 os neurônios não permanecem por muito tempo próximos do potencial reverso ( $V_{rev} = -80 \text{ mV}$ ), mas despolarizam rapidamente, o que se assemelha bastante ao observado nos experimentos.

A Fig. 6.67 mostra o espaço de parâmetros do desvio padrão da frequência de rajadas para o modelo HH2C. Pela figura podemos observar que a rede apresenta comportamento regular na maior

parte do espaço de parâmetros e, portanto, que as séries temporais são bastante estáveis.

Na Fig. 6.67 existe um conjunto de pontos escuros que formam uma faixa quase vertical em  $gKCa \approx 1.6 \text{ mS/cm}^2$ . O sistema passa por uma transição em torno desta faixa, conforme pode ser visto também na Fig. 6.65a pela modificação mais acentuada da frequência da rede e, de forma ainda mais nítida, na Fig. 6.65b. Constatamos que esta transição está associada a uma mudança no tipo de mecanismo que determina a oscilação dos neurônios. Para regiões acima de  $1.6 \text{ mS/cm}^2$ , o disparo do neurônio que está inibido acontece porque o neurônio ativo termina a sua rajada, hiperpolarizando espontaneamente e finalizando a inibição: neste momento o neurônio inibido dispara. A série temporal mostrada na Fig. 6.66d mostra esta situação. Para valores superiores ( $gKCa, >1.6 \text{ mS/cm}^2$ ), o neurônio inibido dispara mesmo durante a inibição do neurônio ativo, devido à corrente IH (Fig. 6.66f).

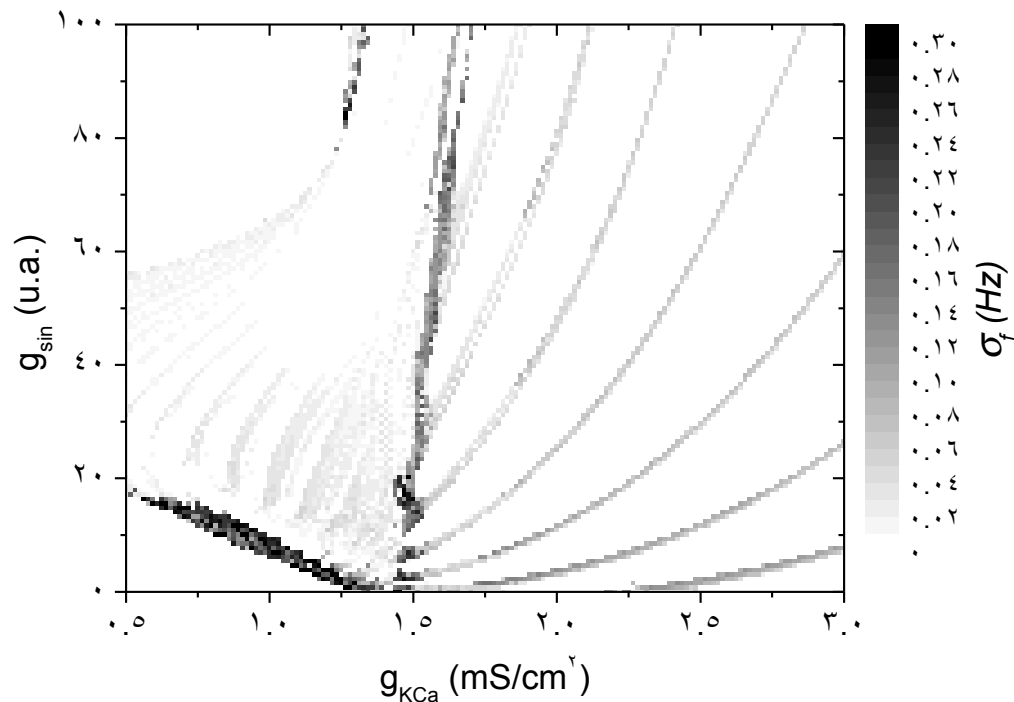
Nas séries temporais da faixa de transição observa-se a alternância entre os dois mecanismos, o que explica o aumento do desvio relativo da frequência destas séries temporais (Fig. 6.66e).

Os neurônios têm o mesmo comportamento intrínseco nas séries temporais mostradas na Fig. 6.66d e Fig. 6.66f. Contudo, observamos uma grande diferença entre estas séries quanto à duração das rajadas. Este efeito está relacionado ao rebote pós-inibitório, que faz com que o neurônio dispare rajadas mais longas após a inibição sináptica, aumentando o ciclo total da rede e, conseqüentemente, diminuindo sua frequência.

Desta forma, podemos dizer que a corrente IH teve um papel duplo na modificação do comportamento da rede. Uma modificação consistiu em proporcionar robustez à rede, fazendo com que os neurônios passassem a disparar em antifase para uma faixa muito mais ampla do espaço de parâmetros. A outra é fazer com que os



neurônios disparem rajadas mais longas quanto maior a inibição, fazendo com que a rede alcance faixas maiores de frequências quando modificamos a condutância sináptica, proporcionando maior flexibilidade à rede.



**Fig. 6.67: Desvio padrão da frequência de oscilação dos neurônios. Podemos observar regiões mais escuras, onde o comportamento das séries temporais é mais irregular, e regiões mais claras, que correspondem a transições entre rajadas com número de potenciais de ação diferentes.**

Em sistemas dinâmicos é bastante comum observarmos comportamento caótico nas transições entre dois tipos de padrões temporais (Alligood et al., 1997; Argyris et al., 1994). Para o caso da dinâmica neural, a origem do comportamento irregular é mais clara, pois há acoplamentos entre duas dinâmicas que ocorrem em escalas de tempo muito diferentes, a das variáveis que geram os potenciais de ação e a das que geram os platôs e as hiperpolarizações. Assim, é muito provável que na transição entre os comportamentos em rajadas e tônico se encontre algum tipo de comportamento caótico. Como vimos na seção anterior, outros

modelos mais detalhados da atividade neural também apresentam comportamento caótico durante a transição entre os dois tipos de comportamento.

Com relação ao comportamento coletivo observado para o modelo de dois neurônios e os argumentos dados acima, observamos que os neurônios devem ter seu comportamento individual entre rajadas e o tônico, exatamente onde a probabilidade de observarmos comportamento caótico é maior. Desta maneira, acreditamos que a presença de caos nos neurônios isolados seja uma consequência natural das condições necessárias para que a rede apresente flexibilidade e robustez.

Acreditamos que os argumentos dados acima sejam uma forte evidência da razão pela qual observamos comportamento caótico em séries temporais de neurônios isolados do CPG pilórico.

#### **6.2.5. Dependência do parâmetro $\tau_s$**

Neuromoduladores podem também alterar a constante de tempo sináptica através de processos pré e pós-sinápticos. Em uma dada sinapse, mudanças podem ocorrer tanto na constante de tempo que governa a ativação dos canais pós-sinápticos quanto, por exemplo, em correntes de cálcio e na liberação de neurotransmissores no processo pré-sináptico (Elson *et al.*, 2002). Com a modificação deste parâmetro em redes, foram observadas mudanças de fases e de frequência (Still *et al.*, 1999; Prinz *et al.*, 2003), além da alternância entre comportamentos em fase e em oposição de fase (Elson *et al.*, 2002).

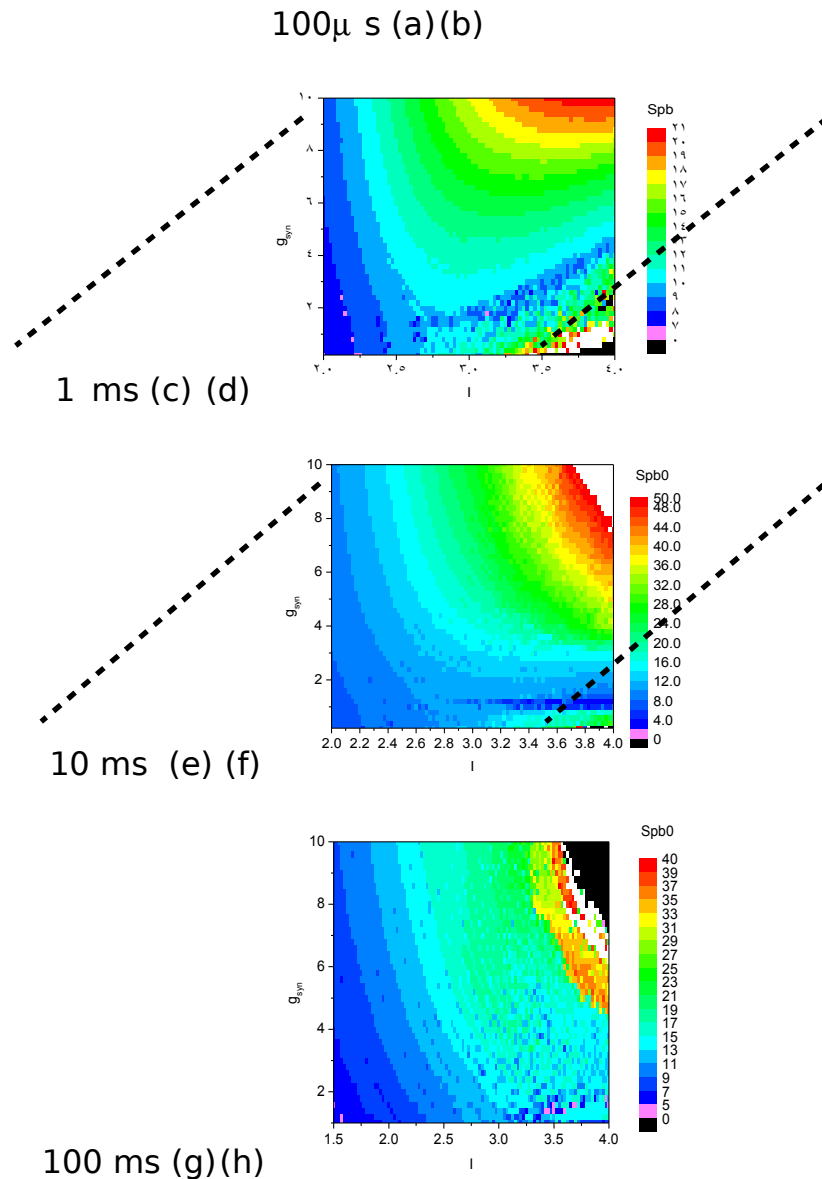
A maioria dos modelos dinâmicos (Destexhe *et al.*, 1994; Abbott e Marder 1998; Nadim *et al.*, 1999; Sharp *et al.*, 1993) produzem uma corrente sináptica que cresce rapidamente com a chegada do pulso pré-sináptico e em seguida decai exponencialmente com tempo característico  $\tau_s$ . As sinapses que

têm tempos de decaimento longos (curtos) são chamadas de sinapses lentas (rápidas).

Aumentar o tempo de decaimento sináptico em relação ao valor médio dos ISIs em uma rajada produz um ganho efetivo na condutância sináptica média: o “alargamento” dos picos de injeção de corrente pós-sináptica devido à maior persistência aumenta a integral da corrente total a cada rajada. Quanto maior o valor de  $\tau_s$ , maior é o tempo que a condutância sináptica permanecerá ativa na célula pós-sináptica após a liberação de neurotransmissores na fenda sináptica.

Acoplamos dois neurônios HR para alguns valores da constante de tempo sináptica  $\tau_s$ . Na Fig. 6.68 mostramos os espaços de parâmetros da frequência (esquerda) e do número de p.a. (direita) por rajada obtidos com quatro valores de  $\tau_s$ , de  $100 \mu s$  a  $100 ms$ . Os espaços de parâmetros para  $\tau_s = 10 ms$ , já mostrados na seção 6.2.2, são repetidos na Fig. 6.68 para comparação.

Podemos verificar que existe uma mudança pequena da configuração das frequências nos espaços de parâmetros quando passamos de  $\tau_s = 100 \mu s$  para  $\tau_s = 1 ms$ . As cores se distribuem de uma maneira aproximadamente igual nos dois casos, tanto para a frequência de rajadas como para o número de potenciais de ação por rajada. Por outro lado, existe uma significativa modificação da distribuição de cores obtida com  $\tau_s = 10 ms$ , em relação a  $\tau_s = 1 ms$ . Para evidenciar esta mudança, desenhemos uma linha pontilhada no gráfico da frequência de rajadas para  $\tau_s = 1 ms$  que mostra uma direção em que o gráfico é percorrido sem mudanças significativas da frequência. Ao percorrermos o gráfico da frequência para  $\tau_s = 10 ms$  através da mesma linha, verificamos um grande acréscimo na frequência de rajadas.



**Fig. 6.68:** Espaços de parâmetros ((a), (c), (e) e (g)) da frequência de rajadas e ((b), (d), (f) e (h)) do número médio de potenciais de ação por rajada de dois neurônios HR acoplados com sinapses inibitórias mútuas para diversos valores de  $\tau_s$ . As escalas de cores são diferentes em cada gráfico e foram escolhidas para maximizar o contraste de cada um deles.

Estas mudanças observadas para  $\tau_s = 1$  ms e  $\tau_s = 10$  ms implicam em alterações funcionais importantes para a rede. Na seção 6.2.2 havíamos especulado que poderíamos descrever a ação de um neurotransmissor que atua simultaneamente na intensidade

do acoplamento sináptico e no comportamento do neurônio isolado através de curvas no espaço de parâmetros, que poderiam ser interpretadas como uma espécie de assinatura da substância. Vamos supor que exista um neuromodulador cuja presença em diferentes concentrações modifica simultaneamente os parâmetros  $g_{sin}$  e  $I$  da rede de acordo com as linhas pontilhadas mostradas na Fig. 6.68(c) e (d). Este percurso não acarreta praticamente nenhuma mudança na frequência de rajadas (Fig. 6.68c). Por outro lado, a mesma linha mostra uma mudança significativa no número de p.a. por rajada (Fig. 6.68d) que vai de valores inferiores a 10 até aproximadamente 17. Uma vez que a frequência de disparo de um neurônio motor está ligada à intensidade de ativação do músculo (Bear *et al.*, 2002), este neuromodulador proporciona uma intensificação da atividade muscular sem modificar a frequência de oscilação da rede, representando um ganho significativo em seu repertório de comportamentos.

O mesmo percurso (representado pela linha pontilhada) para  $\tau_s = 10 \text{ ms}$  (Fig. 6.68e,f), representa uma grande mudança de frequências, e ainda, modificações muito maiores do número de potenciais de ação por rajada. Para  $\tau_s = 10$  e  $100 \text{ ms}$ , como já havíamos observado anteriormente, as mudanças na frequência têm uma correspondência direta com mudanças do número de p.a. por rajada, o que não ocorre para  $\tau_s = 1 \text{ ms}$ .

As diferenças observadas entre  $\tau_s = 1$  e  $10 \text{ ms}$ , mostram que neuromoduladores que atuam no tempo característico das sinapses podem modificar a relação entre o número de p.a. por rajada e a frequência da rede. A atuação concomitante de substâncias que atuam tanto na intensidade da conexão sináptica como no tempo característico de decaimento podem trazer uma gama ainda maior de comportamentos coletivos.

Observando os espaços de parâmetros para os diversos valores de  $\tau_s$  (Fig. 6.68), notamos também que os efeitos mais significativos da modificação de  $\tau_s$  ocorrem nas regiões em que os neurônios são tônicos quando isolados ( $I > 3,2$ ). Nestas regiões observamos uma espécie de “compressão” das regiões de condutância sináptica superiores à medida em que  $\tau_s$  aumenta, ou seja, frequências observadas somente para valores grandes da condutância sináptica passam a ser observados para valores menores desta, quando  $\tau_s$  é aumentado. Como exemplo, podemos citar a região vermelha da Fig. 6.68c que ocorre aproximadamente em  $g_{sin}=4,0$ . Para  $\tau_s=10\text{ ms}$  esta mesma região surge em  $g_{sin}=2,0$  e uma faixa azul superior aparece na região superior do espaço de parâmetros. Já havíamos observado na seção 6.2.2, que os efeitos mais significativos de mudanças na condutância das sinapses no comportamento da rede acontecem quando os neurônios isolados são tônicos, devido a uma maior competição pelos disparos. Isto mostra porque os efeitos da alteração de  $\tau_s$  são mais intensos nas regiões onde os neurônios são tônicos.

A frequência máxima das rajadas de p.a. da rede também diminui em função de  $\tau_s$ . Para  $\tau_s = 100\ \mu s$  a rede chega a frequências superiores a 3,0 Hz, o que não ocorre para valores superiores de  $\tau_s$ . Esta diminuição da frequência máxima está relacionada com a corrente sináptica permanecer ativa mesmo após o término da rajada, mantendo a inibição durante mais tempo e diminuindo o ciclo total de oscilação.

Outra mudança evidenciada pela modificação de  $\tau_s$  é a diminuição da faixa de frequências de rajadas dos neurônios. Isto pode ser observado pelo valor máximo da escala de cores dos gráficos da frequência (gráficos à esquerda na Fig. 6.68). Com o aumento de  $\tau_s$  há uma sucessiva diminuição do valor máximo da

escala, significando que os neurônios tendem a atingir frequências cada vez menores.

Outra informação importante que podemos extrair do sistema é o desvio relativo da frequência  $\left(\frac{\sigma_f}{f}\right) = \sigma_f^{rel}$ , onde  $\sigma_f$  é o desvio padrão da distribuição das medidas de frequência obtidas a cada rajada. A Fig. 6.69 mostra diversos espaços de parâmetros de  $\sigma_f^{rel}$  para os mesmos valores de  $\tau_s$  estudados. Nestes gráficos podemos observar o aumento das áreas em azul em função de  $\tau_s$  (o que corresponde a uma faixa de erro relativo até aproximadamente 10%). Este aumento está principalmente relacionado com as transições de número de potenciais de ação por rajada, associado à rota de adição de períodos. A cada transição entre um número  $n$  de potenciais de ação por rajada para  $n+1$ , surge uma região instável, de comportamento irregular. Com o aumento de  $\tau_s$  estas faixas vão se tornando mais largas e mais frequentes. Outra consequência associada ao aumento de  $\tau_s$  é o gradual desaparecimento da região dos espaços de parâmetros que apresentam valores de  $\sigma_f^{rel}$  superiores a 30% (regiões verdes, vermelhas e cinzas). Acreditamos que este comportamento esteja associado ao aumento da intensidade do acoplamento sináptico que o aumento de  $\tau_s$  proporciona, fazendo com que a sincronização total aconteça mesmo para valores grandes de  $I$ , mas tornando as séries mais instáveis nas transições de período.

Nos gráficos da Fig. 6.69 existem estruturas do tipo línguas de Arnold, típicas de sincronização, que são mais frequentes com o aumento de  $\tau_s$ .

Na Fig. 6.70 e na Fig. 6.71 mostramos algumas séries temporais dos neurônios acoplados para  $\tau_s = 10$  e 100 ms,

respectivamente. De maneira geral, as séries para  $\tau_s$  menores ou iguais a 10 ms são todas muito similares. Para  $\tau_s = 100$  ms (Fig. 6.71) as séries apresentam um comportamento que não corresponde completamente ao observado em séries de dados experimentais, apresentando, por exemplo, potenciais de ação de amplitude muito pequena, e patamares de tensão superiores ao limiar de disparo do neurônio (onde o neurônio deveria sempre disparar potenciais de ação).

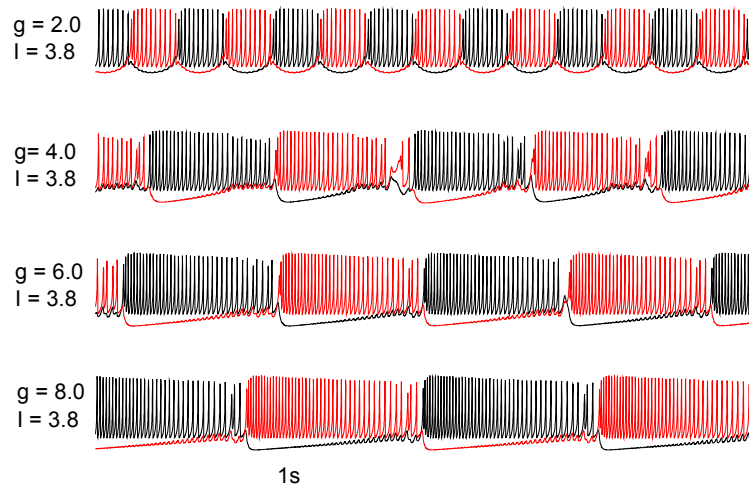
Um resultado que pareceu satisfatório para o julgamento da qualidade das simulações que estamos fazendo foi o fato de que a faixa de  $\tau_s$  em torno de 10ms é a que apresenta séries temporais mais realísticas, e estes valores de  $\tau_s$  são próximos dos inferidos em experimentos. Para  $\tau_s < 10$ ms, observamos uma espécie de saturação do comportamento, já que há poucas diferenças entre os espaços de parâmetros para 100  $\mu$ s e 1ms. Por outro lado, para  $\tau_s = 100$ ms, o comportamento das séries temporais não parece mais corresponder ao observados em séries experimentais, não representando adequadamente o sistema que propõe descrever, sugerindo um limite superior para este parâmetro. No entanto, vale a pena ressaltar que esta inadequação possivelmente esteja ligada a uma limitação do modelo HR, que responde de maneira não realística quando recebe inibição forte durante o disparo de potenciais de ação, produzindo o comportamento mostrado na Fig. 6.71. Possivelmente a baixa dimensionalidade do sistema e ainda o fato dos neurônios serem modelos de compartimento único sejam fatores que contribuam para o desempenho coletivo ruim deste modelo.

100 $\mu$ s 1 ms

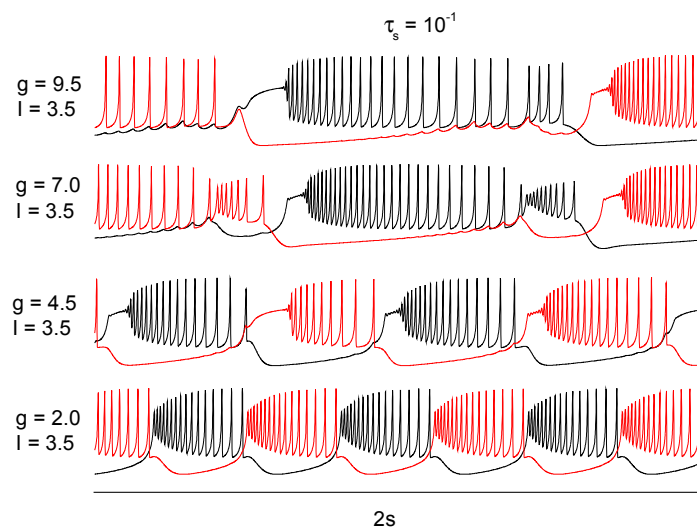
10 ms 100ms

**Fig. 6.69: Desvio relativo  $\sigma_f^{rel}$  da medida de freqüência de rajadas em função dos parâmetros  $I$  e  $gsin$ .**





**Fig. 6.70:** Algumas séries temporais para  $\tau_s = 10$  ms e  $I = 3,8$ . Podemos observar uma grande variação da frequência de rajadas.



**Fig. 6.71:** Potenciais de membrana dos neurônios acoplados para  $\tau_s = 100$  ms. A forma dos potenciais de membrana parece não corresponder ao comportamento observado experimentalmente, com o aparecimento de potenciais de ação de amplitude pequena e patamares acima do limiar de disparo do neurônio.

Durante a rajada de um neurônio, a corrente sináptica injetada no neurônio pós-sináptico é definida pelos parâmetros que caracterizam a sinapse e também por algumas variáveis dinâmicas. Supomos neste trabalho, que os parâmetros sinápticos são constantes, ou seja, as sinapses não apresentam adaptações

dependentes da atividade. Um fator que pode influenciar a “quantidade” de corrente injetada no neurônio pós-sináptico é a taxa de disparo do neurônio pré-sináptico. O efeito de somação (Bear *et al.*, 2002) é bastante conhecido no controle da intensidade da tensão muscular, onde o aumento da taxa de disparos pode proporcionar um aumento não-linear da intensidade de ativação da fibra muscular.

Uma propriedade de neurônios do circuito pilórico é a presença de rebote pós-inibitório (Selverston *et al.*, 1976), que pode ser caracterizado como um aumento da taxa de disparo de um neurônio logo após a supressão de uma corrente inibitória. Em geral, o rebote pós-inibitório é maior quanto maior é a corrente inibitória. Assim, a modificação da “quantidade” de inibição influencia a intensidade do rebote pós-inibitório do neurônio pós-sináptico, aumentando a sua taxa de disparos. Em outras palavras, com maior inibição, decorrente de um aumento de  $g_{sin}$ , o neurônio pós-sináptico hiperpolariza mais e, conseqüentemente, apresenta um maior rebote pós-inibitório e maior taxa de disparo. Quando este neurônio disparar, ele proporcionará uma corrente pós-sináptica ainda maior no primeiro neurônio, devido ao aumento de sua taxa de disparo. Assim o efeito de modificações na condutância sináptica é auto-amplificado, causando uma maior flexibilidade da rede. Com estes argumentos, podemos concluir que a presença de rebote pós-inibitório potencializa o efeito da modificação da condutância sináptica.

Façamos uma análise da corrente injetada no neurônio pós-sináptico em função da taxa de disparo. Inicialmente, vamos imaginar uma situação em que o neurônio pré-sináptico dispara potenciais de ação a uma taxa  $r$  constante. A variável  $S(t)$  (seção 4.5) mostra como a ativação sináptica evolui com o tempo. Esta variável está intimamente ligada à evolução temporal da

condutância sináptica, ou seja, podemos definir uma condutância efetiva como  $g_{ef} = g_{sin} S(t)$ . Evidentemente, este termo não define completamente a quantidade de corrente pós-sináptica, pois esta depende também da diferença entre o potencial da membrana da célula pós-sináptica e o potencial reverso sináptico. No entanto, ela pode fornecer uma idéia de como esta corrente é modificada com mudanças no parâmetro  $\tau_s$  e na taxa de disparo do neurônio pré-sináptico.

Sabemos que a variável  $S(t)$  evolui no tempo da seguinte maneira:

$$\tau_s \frac{dS}{dt} = \frac{S_\infty - S}{1 - S_\infty}$$

Na equação acima,  $S$  se aproxima exponencialmente de  $S_\infty$  com uma constante de tempo  $\tau_{ef} = \tau_s (1 - S_\infty)$  onde  $S_\infty$  depende do potencial pré-sináptico. Durante o potencial de ação,  $S_\infty$  se aproxima rapidamente de 1 e a constante de tempo  $\tau_{ef}$  praticamente se anula, mostrando que  $S$  também tende a 1 quase instantaneamente. Com a diminuição do potencial pré-sináptico  $S_\infty$  tende a zero novamente e  $S$  decai exponencialmente com constante de tempo  $\tau_s$ . Por simplicidade vamos admitir que o potencial de ação tem uma duração suficientemente curta o que faz com que a variável  $S$  tenha saltos no instante em que há um potencial de ação e um sucessivo decaimento exponencial, ou seja, assume a forma de exponenciais sucessivas:

$$S(t) = I \quad \text{no instante do disparo.}$$

$$S(t) = e^{-\frac{t}{\tau_s}} \quad \text{entre dois potenciais de ação e}$$

Calculando a média temporal de  $S(t)$  como

$$\langle S(t) \rangle = \left( \frac{1}{t_1 - t_0} \right) \int_{t_0}^{t_1} S(t) dt$$

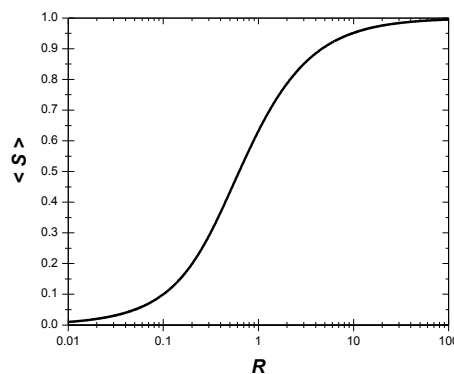
Como a função  $S$  é uma seqüência de exponenciais idênticas, a média em um tempo longo é igual à média entre dois potenciais de ação:

$$\langle S \rangle = \frac{1}{r} \int_0^{1/r} e^{-t/\tau_s} dt$$

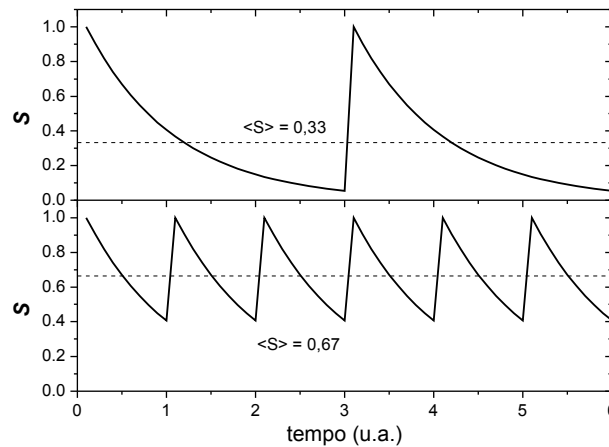
e, portanto,

$$\langle S \rangle = R \left( 1 - e^{-\frac{1}{R}} \right),$$

onde  $R = r\tau_s$  é a taxa de disparos normalizada, ou seja, o número de potenciais de ação que o neurônio dispara durante o período de  $1\tau_s$ .  $R \ll 1$  significa que o tempo  $\tau_s$  é muito maior do que o intervalo entre disparos. Podemos então observar que  $\langle S \rangle$  cresce linearmente quando  $R$  está próxima de zero e depois satura em 1,0 para  $R$  grande (Fig. 6.72). Este resultado mostra também que  $\langle S \rangle$  depende somente do produto entre a taxa de disparo da célula pré-sináptica e de  $\tau_s$ , mostrando a íntima relação entre estes dois últimos fatores na determinação da corrente pós-sináptica. A Fig. 6.73 mostra dois casos onde  $R$  assume valores diferentes e mostrando como isto afeta o valor de  $\langle S \rangle$ .



**Fig. 6.72: Valor médio aproximado da variável  $S(t)$  em função da taxa de disparo normalizada em escala logarítmica. A maior variação de  $\langle S \rangle$  ocorre em  $1.0 \geq R \geq 10$ .**



**Fig. 6.73: Dois casos diferentes de R mostrando que  $\langle S \rangle$  se altera significativamente com a taxa de disparo. Em ambos os casos o  $\tau_s$  é igual, mas a taxa de disparo é diferente. Isto resulta em valores de R diferentes e portanto em valores distintos de  $\langle S \rangle$ .**

Esta análise é bastante simplificada, pois não leva em consideração particularidades dinâmicas do comportamento dos neurônios. O seu benefício, no entanto, está numa compreensão de como a constante de tempo sináptica se relaciona com a taxa de disparo dos neurônios para produzir comportamentos distintos.

Se tomarmos como base os dados obtidos na seção (6.1), para o modelo HR, podemos observar pelos diagramas de bifurcações que os intervalos entre disparos típicos variam de 20 a 60 ms o que equivale a uma taxa média de aproximadamente 25 disparos por segundo. Com esta estimativa podemos calcular o valor de R em função dos parâmetros  $\tau_s$  utilizados nas simulações. Estes valores são mostrados na Tabela 4.

Nesta tabela podemos observar que os valores de  $\langle S \rangle$  correspondentes aos tempos de decaimento sinápticos não se modificam muito entre  $\tau_s = 0,1$  e  $1,0$  ms. Por outro lado observamos modificações mais significativas para valores superiores de  $\tau_s$ .

Estas observações são compatíveis com o observado nos espaços de parâmetros o que nos leva a crer que o cálculo de  $\langle S \rangle$

pode ser útil na estimativa da faixa de parâmetros em que modificações na constante de decaimento sináptica  $\tau_s$  proporcionam maior efeito no comportamento da rede.

$\tau_s$	R	$\langle S \rangle$
(ms)		
0,1	250	0,998
1	25	0,980
10	2,5	0,824
100	0,2	0,245

**Tabela 4: Valores de R em função dos valores de  $\tau_s$  utilizados nas simulações.**

### 6.3. Acoplamentos de três neurônios

Desenvolvemos um modelo de conectividade de uma rede com três neurônios modelo que se baseia na topologia do CPG pilórico de crustáceos (Selverston, 1986; Selverston *et al.*, 2001). Os neurônios do circuito biológico podem ser divididos em três grupos funcionais, cada grupo representando neurônios que disparam simultaneamente ou com fases próximas. Utilizamos um único neurônio para representar cada um destes grupos. Esta topologia é aceita como uma boa simplificação para a rede que gera o ritmo trifásico do circuito pilórico (Prinz *et al.*, 2004; Prinz *et al.*, 2003b; Rabinovich *et al.*, 2005).

O modelo de rede que utilizamos é mostrado na Fig. 6.74. Um dos neurônios representa o grupo marca-passo, formado pelo neurônio AB e pelos dois PDs. Os outros dois grupos representam os neurônios PY/VD e LP/IC, respectivamente. Por simplicidade, nos resultados experimentais nos referimos a estes grupos simplesmente como AB, PY e LP.

A forma com que os neurônios são conectados é baseada no fato de que o grupo marca-passo recebe somente uma sinapse

inibitória, proveniente do neurônio LP. Já os outros neurônios têm sinapses inibitórias mútuas. Os valores dos parâmetros sinápticos foram considerados idênticos para todas as sinapses da rede, com exceção das condutâncias sinápticas (Fig. 6.74). Em cada sinapse, a condutância  $g_{sin}$  é calculada em função de um parâmetro  $g$ , que determina o valor de todas as condutâncias sinápticas do circuito, e que foi modificado na mesma faixa que nas simulações com dois neurônios. O parâmetro que controla o comportamento intrínseco dos neurônios também foi considerado igual para todos os neurônios.

**Fig. 6.74: Esquema de conexão sináptica do modelo de três fases para o circuito pilórico. Todas as sinapses são inibitórias e idênticas, com exceção das condutâncias sinápticas máximas, calculadas em função do parâmetro  $g$ . O parâmetro  $\lambda$ , que controla o comportamento dos neurônios também foi considerado igual para todos os neurônios.**

Nos espaços de parâmetros, a não ser quando fazemos algum comentário, mostramos as medidas obtidas com o neurônio que representa o grupo marca-passo. No caso da frequência, a medida feita para o grupo marca-passo é representativa para toda a rede, pois todos os neurônios oscilam com a mesma frequência para a grande maioria das simulações.

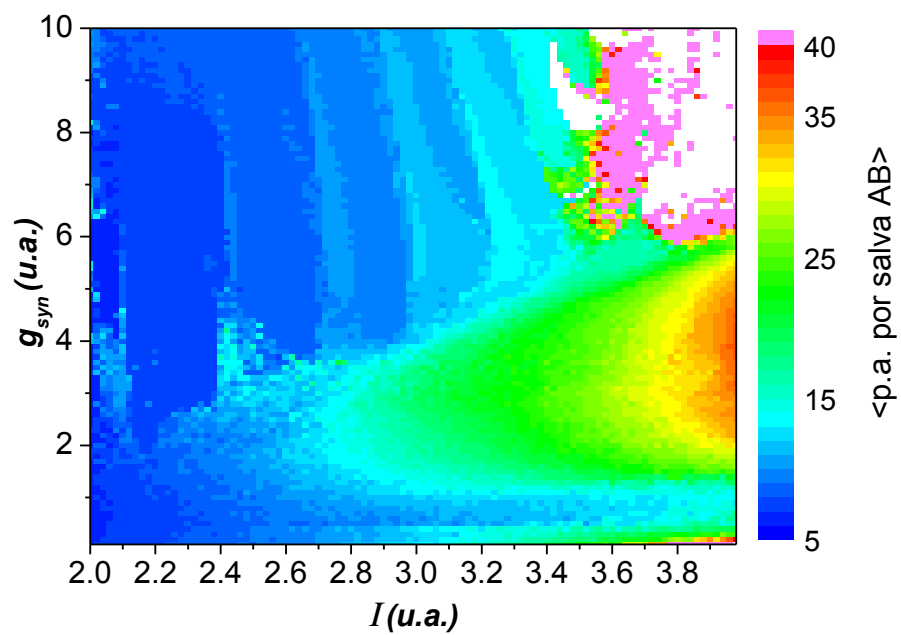
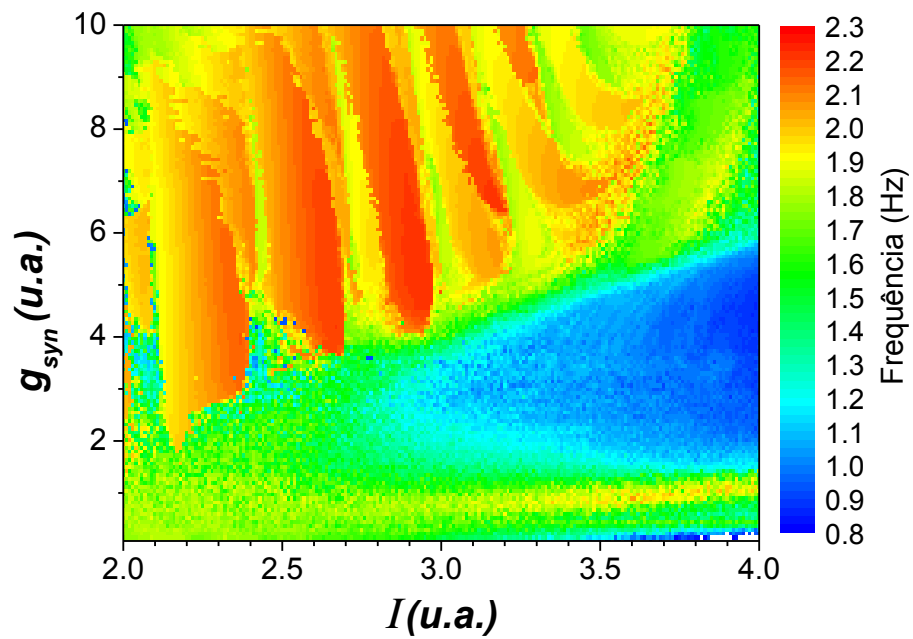
### 6.3.1. Redes com o modelo HR

Os espaços de parâmetros para o modelo HR podem ser vistos na Fig. 6.75. Observamos para estas redes algumas características que já haviam sido observadas para as redes de dois neurônios. Para valores de  $I$  que tornam o comportamento intrínseco dos neurônios em rajadas (valores menores), temos uma variação de frequências muito menor do que quando os neurônios são tônicos (valores maiores). Por outro lado, quando os neurônios são intrinsecamente tônicos, o neurônio LP deixa de disparar potenciais

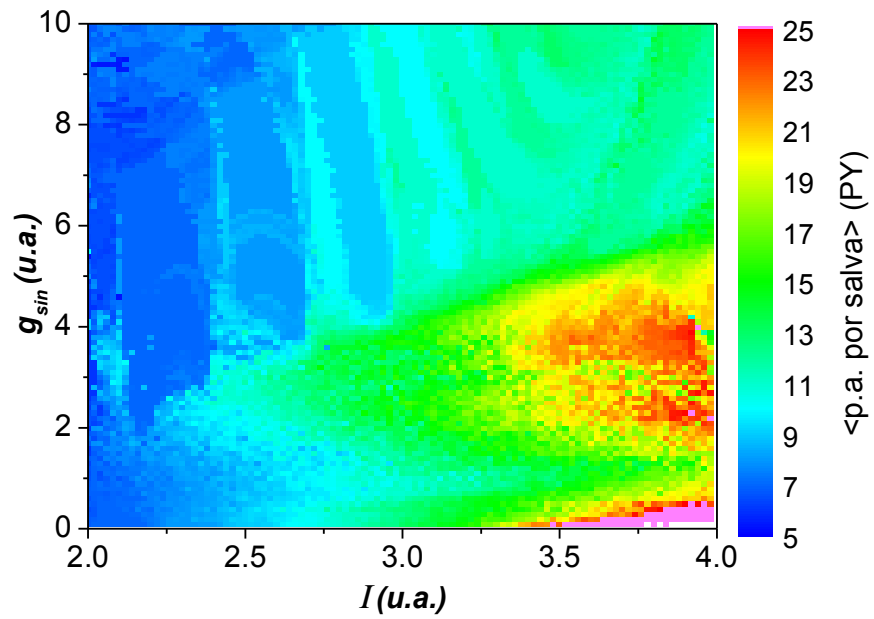
de ação, executando somente oscilações abaixo do limiar de disparo (subliminares). A diminuição do número de potenciais de ação do neurônio LP até quando ele deixa de dispará-los pode ser vista na Fig. 6.75d. As regiões brancas mostram os parâmetros onde este neurônio não dispara potenciais de ação. O LP apresenta tal comportamento devido ao fato de receber maior inibição dos demais neurônios da rede. Assim, quando as condutâncias são altas e os neurônios são intrinsecamente tônicos, este neurônio recebe uma quantidade muito grande de correntes inibitórias, praticamente de forma contínua, e acaba não disparando mais.

Em torno dos valores de  $I = 2.8$  a  $3.2$  (aproximadamente), que correspondem à atividade caótica, ocorre uma grande aproximação entre as línguas de Arnold de alta frequência e a região onde estão as frequências de oscilação mais baixas. Nas proximidades destes valores de  $I$ , uma alteração de duas vezes no valor de  $g_{sin}$  corresponde a uma alteração de frequência da rede em torno de quatro vezes, o que implica uma grande flexibilidade.



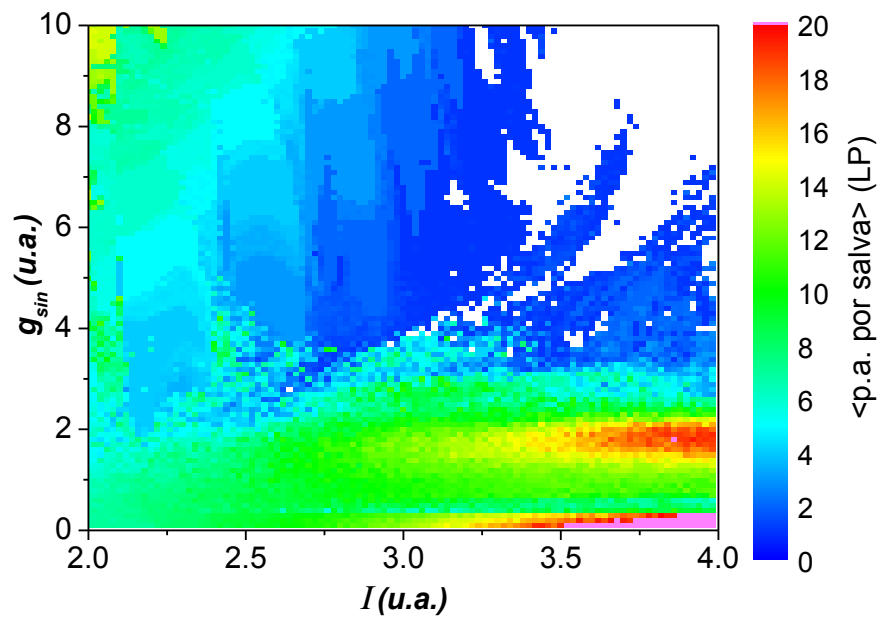


**Fig. 6.75:** Espaços de parâmetros da frequência (a) e do número médio de potenciais de ação por salva para uma rede com três neurônios HR.

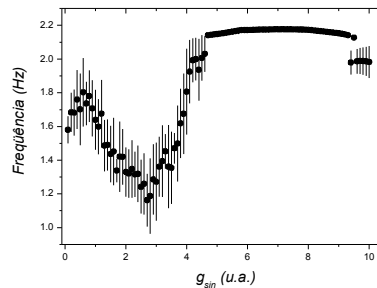


(c)

(d)



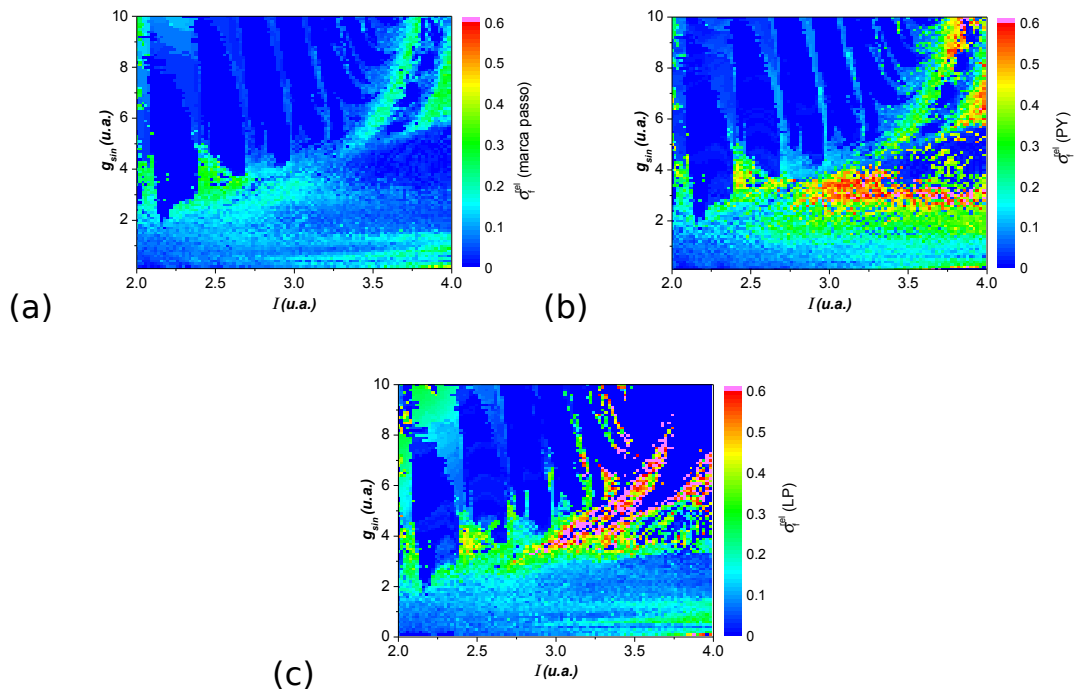
Erro! Vínculo não válido. (continuação): Espaços de parâmetros da frequência (a) e do número médio de potenciais de ação por salva para uma rede com três neurônios HR.



**Fig. 6.76: Frequência de oscilação da rede com três neurônios para  $l = 2,84$  mostrando um travamento de frequência. As barras de erro mostram o desvio padrão das medidas. Durante o travamento a frequência varia pouco em função de  $g_{sin}$  e o comportamento é bastante periódico, como evidenciado pelo baixo desvio padrão.**

Observamos que a quantidade e a largura das línguas de Arnold formadas nos espaços de parâmetros são bem maiores do que para redes de dois neurônios. Em cada uma destas línguas, a frequência da rede varia muito pouco e as séries temporais são muito regulares (Fig. 6.76).

Na Fig. 6.77 mostramos os espaços de parâmetros do desvio relativo da frequência de oscilação ( $\sigma_f/f$ ) de cada um dos neurônios da rede. Utilizamos a mesma escala de cores em todos os gráficos para possibilitar uma melhor comparação. Poderíamos imaginar que a variabilidade observada em um neurônio deveria se refletir nas medidas dos outros neurônios, mas não é o caso. Os valores mais altos do desvio relativo não ocorrem nas mesmas regiões para os três neurônios. Estas diferenças estão principalmente ligadas ao fato de que certas combinações dos parâmetros podem ser desfavoráveis ao disparo de um determinado neurônio, como acontece com o LP para valores grandes de  $l$  e  $g_{sin}$ . Se o neurônio deixa de disparar potenciais de ação em um dos ciclos, isto tem um efeito grande na medida do desvio padrão da frequência deste neurônio, mas não necessariamente na dos demais. Esta característica fornece a possibilidade de identificar as regiões onde os neurônios têm menos probabilidade de disparar.



**Fig. 6.77: Desvio relativo  $\sigma_{f^{rel}}$  da medida da frequência de oscilação do grupo marca-passo (a), LP (b) e PY(c). Os três gráficos utilizam a mesma escala de cores, permitindo uma comparação direta. Os neurônios apresentam picos de  $\sigma_{f^{rel}}$  em regiões diferentes do espaço de parâmetros.**

A variabilidade observada nas medidas de frequência da região verde/amarela, com alternância aparentemente aleatória entre diferentes cores, sugere uma instabilidade da rede para estes parâmetros. Em geral, podemos supor que variações pequenas dos parâmetros levam a variações pequenas das frequências, com exceção das regiões do espaço de parâmetros em que o sistema sofre bifurcações. Assim, as regiões estáveis devem possuir variações suaves de cores até as bifurcações, onde ocorrem saltos de cores. Isto dá ao espaço de parâmetros uma aparência lisa, o que não é observado para valores baixos de  $g_{sin}$  nos espaços de parâmetros ((4.1)). A instabilidade pode ser observada também nos gráficos do desvio relativo da frequência, Fig. 6.77.

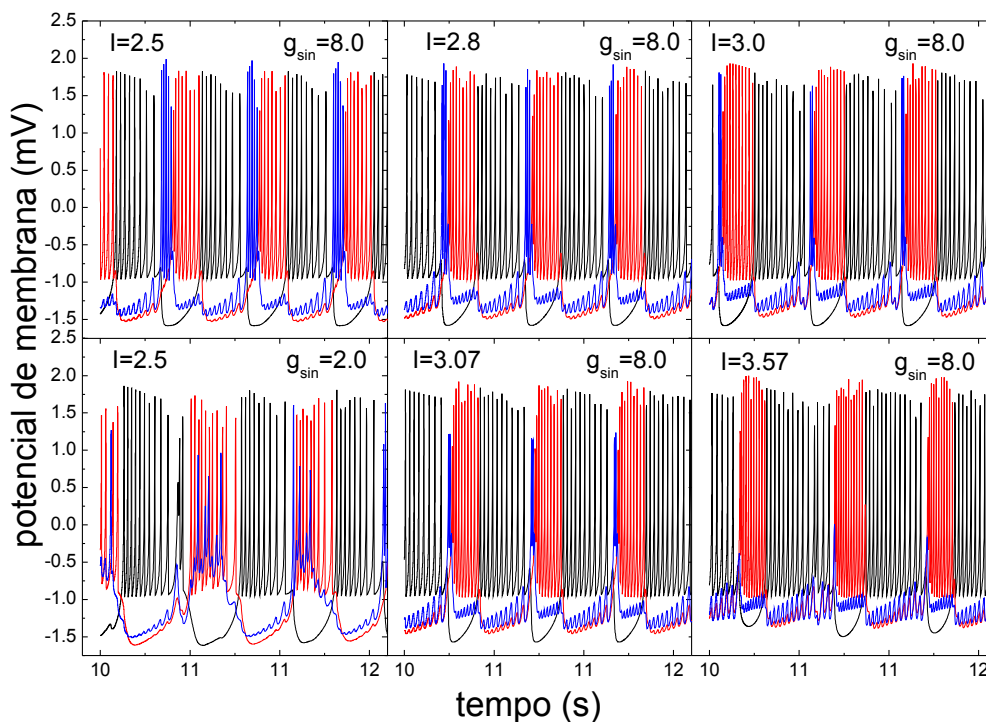
A grande faixa do espaço de parâmetros onde as séries temporais são instáveis evidencia algumas limitações relacionadas

ao modelo de HR na descrição de circuitos compostos com três neurônios. Seguramente estas limitações se manifestarão ao tentar-se compor redes maiores e possivelmente esta seja a razão porque não se conseguiu, até o momento, produzir um modelo completo e funcional do circuito pilórico usando neurônios modelo tipo HR. A incapacidade de gerar hiperpolarizações longas aliada ao fato de rajadas simultâneas gerarem instabilidades nas séries temporais são os principais fatores que fazem com que o modelo HR seja insatisfatório para descrever redes com três ou mais neurônios. Apesar de ser muito bom para descrever a atividade de neurônios isolados e captar as principais características que envolvem esta atividade, o comportamento coletivo torna-se insatisfatório quando o número de neurônios cresce.

Utilizando modelos muito simples de neurônios Skinner, *et al.* (1994) mostraram que o comportamento oscilatório de pequenas redes dependem do tipo de mecanismo que faz um neurônio da rede passar de um estado ativo (disparando potenciais de ação) para um estado hiperpolarizado. Os quatro mecanismos identificados pelos autores foram denominados de liberação sináptica, escape sináptico, liberação intrínseca e escape intrínseco. Os mecanismos de liberação mostram que o neurônio pode deixar de exercer a inibição tanto por hiperpolarizar espontaneamente (liberação intrínseca) quanto por atingir um potencial abaixo do limiar de disparo, diminuindo a corrente pós-sináptica (liberação sináptica). Os mecanismos de escape descrevem situações em que o neurônio que é inibido consegue disparar mesmo com a injeção de corrente sináptica (escape intrínseco) ou atinge um potencial superior ao limiar de disparo, gerando uma corrente pós-sináptica suficiente para hiperpolarizar o outro neurônio (escape sináptico).

Apesar dos resultados encontrados pelos autores serem muito simplificados, tanto no modelo quanto nas possibilidades, podemos estender algumas destas idéias para o nosso trabalho.

Observamos que as redes compostas por três neurônios HR funcionam quase sempre sob o mesmo mecanismo, o de escape intrínseco. As fases são geralmente determinadas pelo mesmo tipo de mecanismo, o de escape intrínseco, como pode ser visto na Fig. 6.78. Ou seja, o neurônio que é inibido vence a inibição sináptica para disparar. Isto faz com que o circuito trifásico nunca apresente as “pausas” observadas em redes biológicas, onde entre o final de um ciclo e o início do outro não se observam disparos de nenhum neurônio.



**Fig. 6.78:** Algumas séries temporais de três neurônios HR acoplados. É possível observar que para um neurônio disparar é necessário que ele vença a inibição sofrida pelos demais neurônios: o ritmo sempre se estabelece sob o mecanismo de escape intrínseco.

### 6.3.2. Redes com o modelo HH2C

Nas redes de três neurônios HH2C, a seqüência de disparo dos neurônios é AB, PY e LP, diferente do que observamos nas redes com neurônios HR e também diferente dos dados experimentais. Neste caso, não conseguimos identificar o mecanismo que gera o padrão, como foi feito para as redes de dois neurônios. Entretanto, o rebote fraco apresentado por este modelo é provavelmente o responsável pelo estabelecimento desta ordem de disparos.

Utilizamos dois métodos para construir os espaços de parâmetros para o modelo HH2C e obtivemos resultados diferentes, como mostramos na Fig. 6.79, o que não foi observado nos outros modelos.

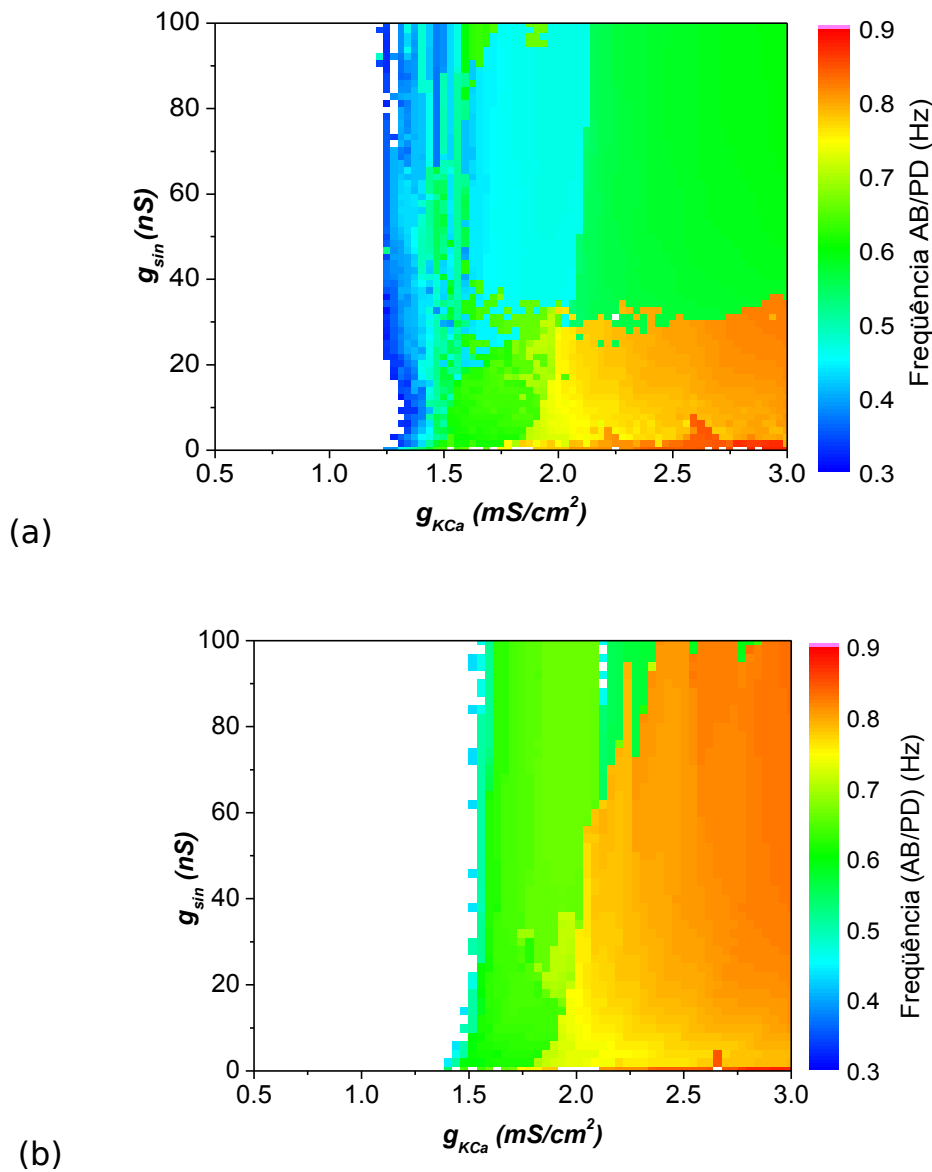
Para investigarmos as causas destas discrepâncias, observamos as séries temporais dos três neurônios e constatamos que elas apresentavam bi-estabilidade para alguns parâmetros.

Uma análise mais profunda mostrou que podem existir dois tipos de instabilidades associadas a séries de três neurônios HH2C. Em um dos casos, os neurônios podem disparar em seqüência, um de cada vez, dando origem a um comportamento trifásico. Para alguns parâmetros, além deste tipo de oscilação, os neurônios podem oscilar de forma bifásica, onde a cada ciclo dois neurônios disparam juntos. Estes comportamentos são mostrados na Fig. 6.80. Os dois tipos de comportamento podem coexistir para um mesmo conjunto de parâmetros, demonstrando a existência de bi-estabilidade nas séries temporais.

Para entender melhor este tipo de comportamento, foram feitas duas simulações com a rede de três neurônios: uma em que o parâmetro  $g_{sin}$  é aumentado sucessivamente e outra na qual o mesmo parâmetro é diminuído. Nas duas simulações o parâmetro  $g_{KCa}$  é fixo e igual a 2.8 mS/cm<sup>2</sup>. Para cada valor de  $g_{sin}$  as equações eram integradas durante 10s que foram descartados e em seguida a

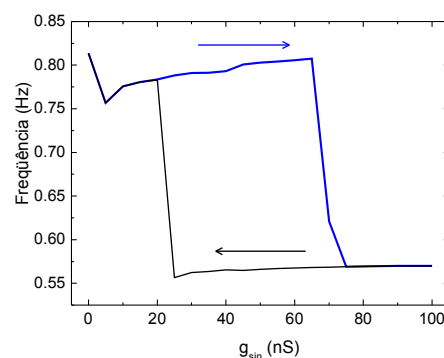
freqüência dos neurônios era medida utilizando os 10 s subsequentes. Então a condutância sináptica foi modificada de um passo igual a  $5\text{ nS}$  e uma nova integração foi feita, utilizando as condições finais da integração anterior como condições iniciais. Estas medidas são mostradas na Fig. 6.81. Inicialmente a condutância foi aumentada (curva em azul) até  $g_{sin}=100\text{ nS}$  e em seguida diminuída (curva em preto) até chegar o valor inicial  $g_{sin}=0\text{ nS}$ .





**Fig. 6.79:** Espaços de parâmetros da frequência de oscilação do grupo marca-passo. Em cada um dos gráficos a variação dos parâmetros foi feita de maneira diferente, dando origem a gráficos diferentes devido à biestabilidade das séries temporais. Em (a) a cada integração das equações a condutância sináptica foi decrescida de 1nS, iniciando em 100 até chegar a 0 nS para cada valor de  $g_{KCa}$ . Em (b) a condutância foi acrescida de 1nS, partindo de 0 até 100nS.

**Fig. 6.80:** Três séries temporais para os mesmos valores dos parâmetros ( $g_{KCa} = 2.8 \text{ mS/cm}^2$  e  $g_{sin} = 60 \text{ nS}$ ) que partem de condições iniciais diferentes. São mostradas duas situações limites diferentes, uma em que os neurônios disparam um após o outro, executando um ritmo trifásico e a outra em que dois neurônios disparam juntos, executando um ritmo bifásico. Em (a) e (b) são mostradas duas condições iniciais que levam ao comportamento trifásico e em (c) uma condição inicial em que os neurônios PY e LP disparam juntos, e que permanece estável, gerando o comportamento bifásico.

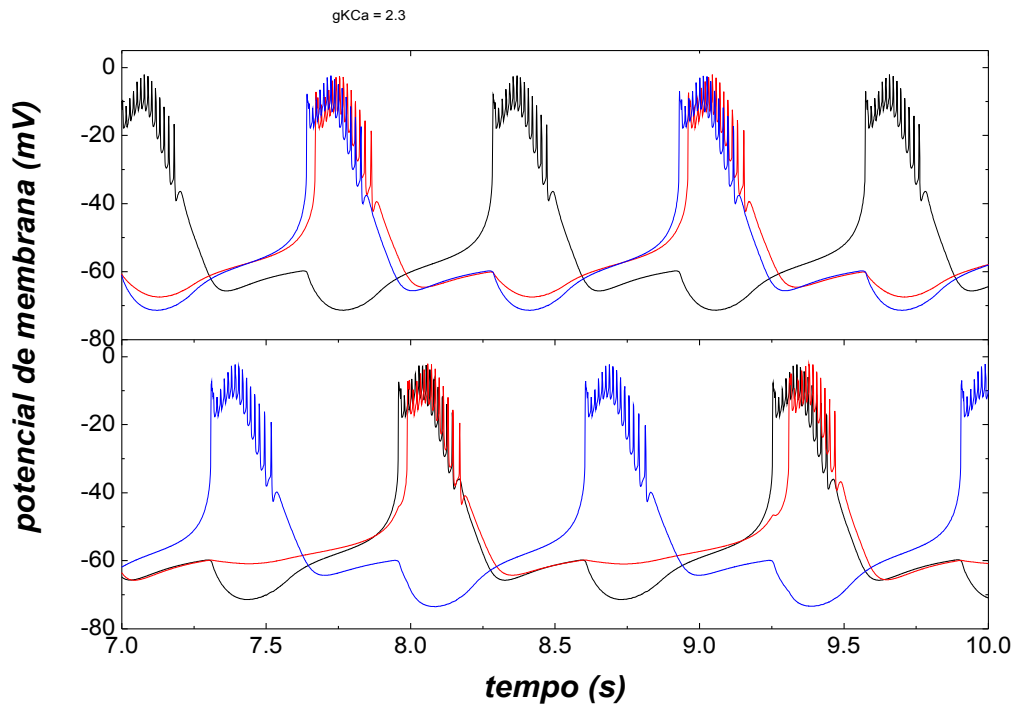


**Fig. 6.81:** Duas curvas da frequência em função da condutância sináptica para  $g_{KCa} = 2.8 \text{ mS/cm}^2$ . A curva azul mostra a frequência medida quando aumentamos a condutância sináptica e a curva preta quando diminuimos o mesmo parâmetro. A cada simulação, utilizamos as condições finais do arquivo anterior como condições iniciais para a próxima simulação. O comportamento observado mostra que o modelo apresenta histerese.

Os caminhos diferentes percorridos pelas curvas de frequência dependendo da direção na qual os parâmetros são variados mostram a histerese que o modelo apresenta. Quando a curva é aumentada, partindo de condutâncias baixas, o comportamento típico é do tipo bifásico, onde dois neurônios disparam juntos. Com a modificação pequena dos parâmetros e a utilização das condições finais anteriores para a integração, o comportamento se mantém até um comportamento crítico, no qual se torna instável e os neurônios passam a oscilar em um ritmo trifásico. Ao diminuirmos a condutância, o comportamento trifásico se mantém mesmo para valores menores de condutância, mas também sofre uma transição para valores pequenos de  $g_{sin}$ .

Além desta instabilidade associada a alternância entre comportamento trifásico e bifásico, encontramos também um outro tipo de instabilidade, mostrada na Fig. 6.82. Neste caso, observamos dois tipos de oscilação: uma em que os neurônios LP e PY disparam juntos e outra em que isto acontece com os neurônios AB e PY.

Estas instabilidades demonstram outras desvantagens do modelo HH2C. Em redes como o circuito pilórico, as instabilidades mostradas pela bi-estabilidade representariam uma completa disfunção do conjunto, pois a ordem de disparo dos músculos passaria por uma inversão repentina. Com a histerese esta situação seria ainda mais desvantajosa já que para restabelecer o funcionamento é necessário modificar muito a condutância sináptica. Além disto, nunca foram observadas alternâncias entre as fases dos neurônios, nem mudanças repentinas entre comportamento bifásico e trifásico em dados experimentais do circuito pilórico.



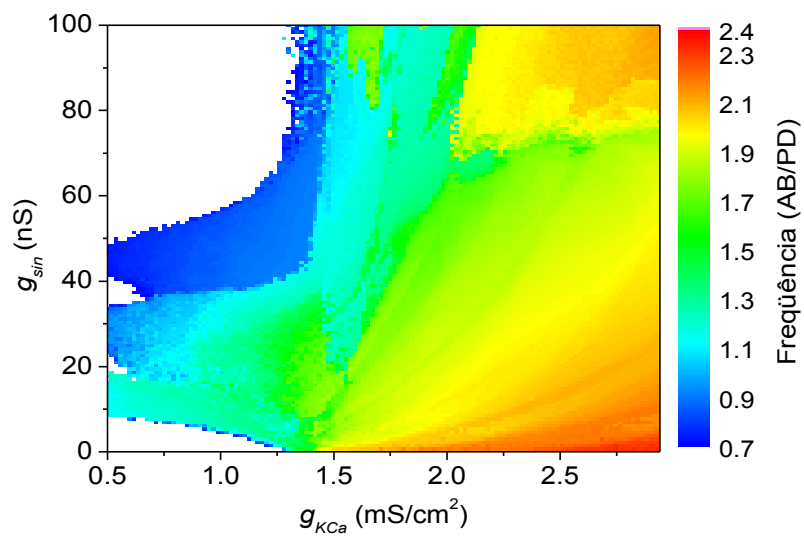
**Fig. 6.82:** Duas séries temporais para  $g_{sin} = 2.3$  e  $g_{KCa} = 10$  nS que foram iniciadas com condições iniciais diferentes. As duas séries apresentam comportamentos finais diferentes, mostrando outro tipo de bi-estabilidade das séries para estes parâmetros.

### 6.3.3. Redes com o modelo HHIH

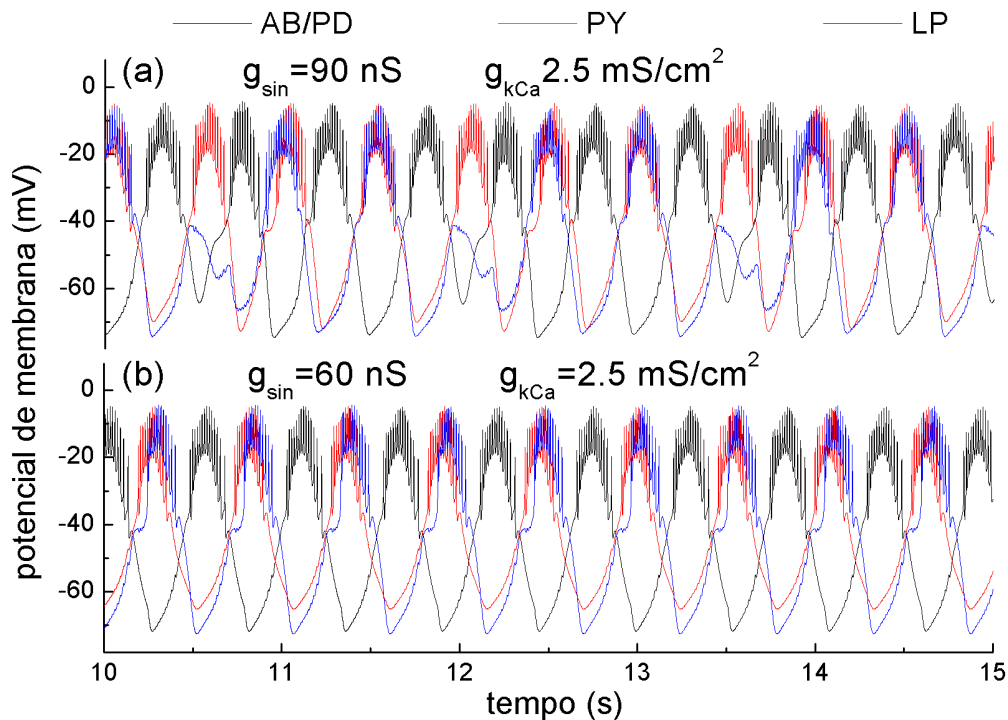
As redes com três neurônios HHIH mostraram um comportamento diferente do observado com o modelo HH2C, como pode ser visto na Fig. 6.83. Nesta figura observamos uma transição abrupta próxima de  $g_{sin} = 70$  nS para valores de  $g_{KCa} > 2.0$  mS/cm<sup>2</sup>. Esta transição está associada a uma mudança de regime de oscilação, conforme podemos observar na Fig. 6.84. Esta mudança é similar à observada para o modelo HH2C, onde os neurônios oscilavam em um regime trifásico. Naquele caso, ao aumentarmos a condutância sináptica, o disparo simultâneo de dois neurônios se torna instável, pois qualquer diferença no instante dos disparos, faz com que o neurônio que disparou primeiro iniba o outro, impedindo os disparos concomitantes. Um mecanismo similar faz com que a transição seja observada no modelo HHIH. Contudo, o regime

trifásico não foi observado para este modelo, mesmo variando as condições iniciais (Fig. 6.86).

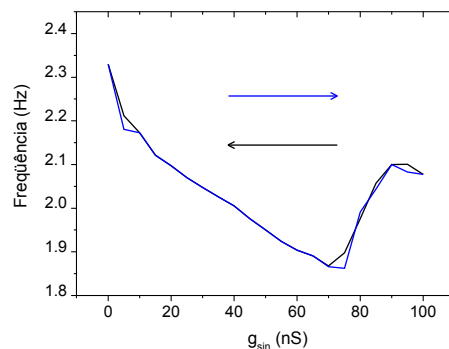
Verificamos também que a transição associada com esta instabilidade no comportamento do neurônio LP não apresenta histerese (Fig. 6.85).



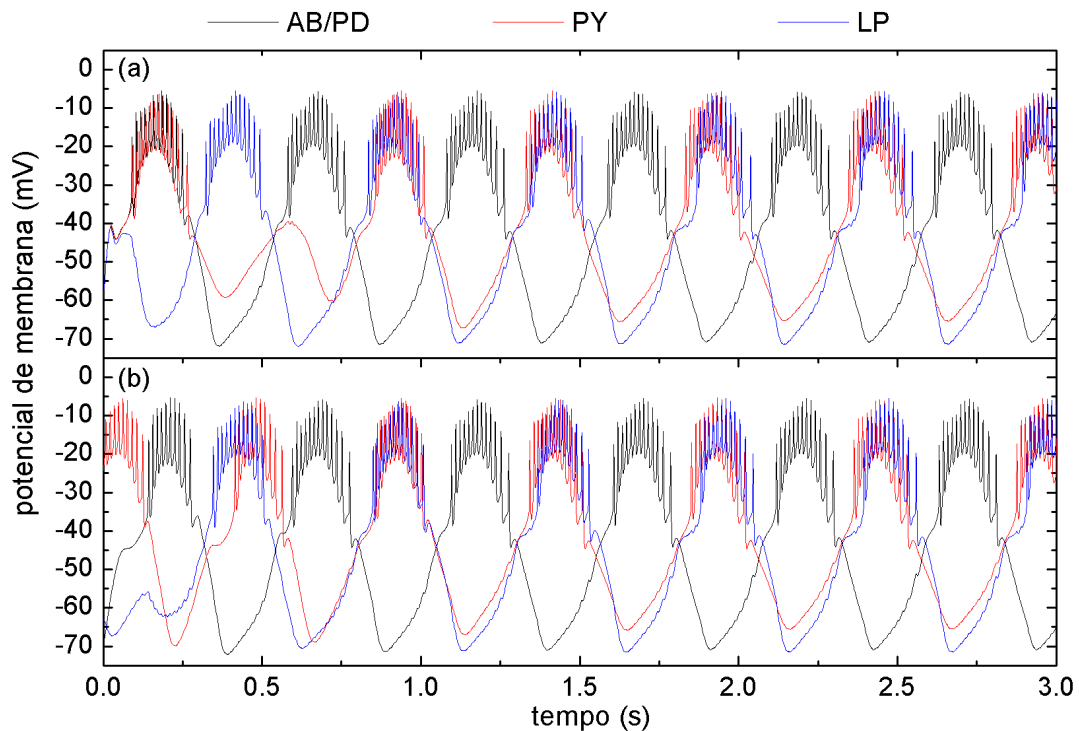
**Fig. 6.83: Espaço de parâmetros da frequência para o modelo HHIH.**



**Fig. 6.84:** Séries temporais que mostram a transição observada na frequência de oscilação da rede para  $g_{KCa}=2.5 \text{ mS/cm}^2$ . Em (a)  $g_{sin}=90\text{nS}$  e o neurônio LP tem um comportamento irregular, ora disparando juntamente com o PY, ora ligeiramente deslocado. Em (b)  $g_{sin}=60\text{nS}$ , e o comportamento instável do LP não é observado.



**Fig. 6.85:** Frequência de oscilação da rede ao aumentarmos seqüencialmente a condutância sináptica (curva azul) e ao diminuirmos o mesmo parâmetro (curva preta). Usamos a condição final de cada integração como condição inicial para a seguinte. O comportamento mostrado na figura revela que não há histerese.



**Fig. 6.86: Duas condições iniciais que levam ao mesmo comportamento mostrando evidências de que não há bi-estabilidade para o modelo HHIH. Em (a) as condições iniciais dos neurônios AB e PY são iguais. Em (b) as condições iniciais correspondem a uma oscilação trifásica. Em ambos os casos o comportamento final é o mesmo.**

## ***6.4. Introdução de perturbações nas variáveis dinâmicas***

Na seção 6.2 argumentamos sobre algumas possíveis razões de observarmos comportamento irregular em neurônios isolados. Os argumentos dinâmicos sugerem que o comportamento isolado deve estar entre o comportamento tônico e em rajadas, faixa onde a probabilidade de encontrarmos comportamento caótico é grande. No entanto, outros argumentos podem ser dados, tais como os utilizados para a elaboração de modelos estocásticos.

Em um recente trabalho (Carelli *et al.*, 2005), mostramos que a tradução de um modelo determinístico do tipo HH de um neurônio

do STG resulta em comportamentos irregulares similares aos observados em séries temporais dos neurônios biológicos. Além disto, observou-se que o comportamento obtido com o modelo estocástico seria indistinguível de um comportamento caótico, caso fossem utilizadas as técnicas de caracterização de séries temporais.

Uma vez que o modelo estocástico foi baseado nas equações determinísticas, o efeito das flutuações estatísticas no número de canais iônicos pode, a grosso modo, ser comparado à adição de ruído nas equações originais (Rowat e Elson, 2004; White *et al.*, 2000).

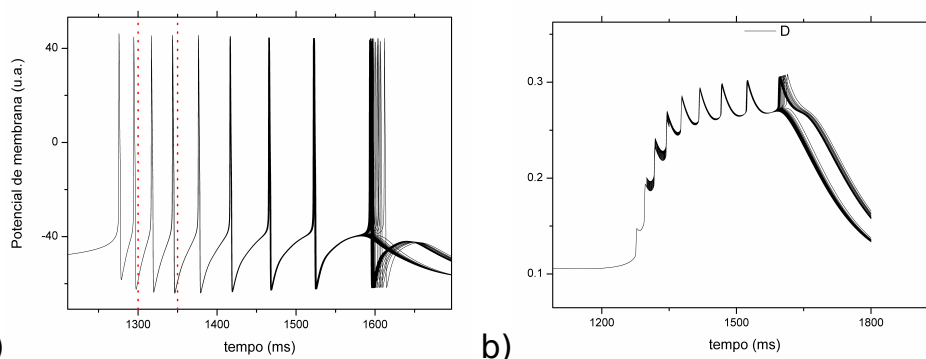
Investigamos esta questão introduzindo perturbações em algumas variáveis dinâmicas em diversos pontos da evolução temporal do modelo determinístico. Para isto, integramos as equações do modelo diversas vezes, sempre partindo das mesmas condições iniciais. Em cada uma das integrações, efetuamos uma perturbação em um instante diferente e observamos a evolução temporal após a perturbação. A perturbação consistia em modificar o valor de uma das variáveis dinâmicas no instante da perturbação.

A Fig. 6.87 mostra estas simulações para o modelo HH1C em que as perturbações foram feitas na variável dinâmica de ativação da corrente de potássio dependente de cálcio  $m_{KCa}$ , entre os instantes 1300 e 1400 ms. A variável perturbada tem o seu valor acrescido de 0.01 no instante da perturbação. Dependendo do instante em que a perturbação é aplicada, o número de potenciais de ação da rajada é diferente, mostrando que a pequena alteração do valor da variável dinâmica é capaz de modificar o padrão de comportamento do neurônio. Esta perturbação poderia ser causada por uma flutuação do número de canais ativos naquele instante.

Podemos interpretar estas observações da seguinte maneira. O fato das órbitas do sistema passarem freqüentemente próximas de separatrizes (como as que separam o comportamento tudo-ou-



nada dos potenciais de ação, por exemplo) pode fazer com que ruídos muito pequenos tenham conseqüências grandes no comportamento final do sistema. Como a dimensão do sistema é bastante grande (12), é bem provável que as órbitas passem perto de diversas outras separatrizes cuja identificação não é óbvia. Além disto as perturbações estocásticas causadas pelas flutuações dos canais iônicos têm direções muito variadas, podendo fazer com que o sistema ultrapasse linhas proibidas pelo sistema determinístico, o que proporcionaria um comportamento mais rico ao sistema.



**Fig. 6.87: Resultados de diversas integrações do modelo HH1C partindo das mesmas condições iniciais e perturbando a variável dinâmica  $m_{KCa}$  em instantes diferentes, entre 1300 e 1400ms. O instante  $t=0$ ms equivale aproximadamente ao início da rajada anterior. Em (a) mostramos o potencial de membrana do neurônio e a faixa de instantes em que foram feitas as perturbações. Dependendo do instante da perturbação, a célula pode disparar um potencial de ação a mais na rajada. (b) Variável  $m_{KCa}$  na qual foi feita a perturbação, que é aparentemente atenuada, mas posteriormente tem um efeito bastante significativo, determinando o número de disparos da rajada. Figuras gentilmente cedidas por Pedro V. Carelli.**

Desta forma, podemos imaginar que o comportamento irregular poderia ser causado por perturbações das variáveis dinâmicas ao longo da própria evolução temporal. No entanto, não é suficiente que exista a perturbação, mas sim que o sistema responda de forma não-linear a esta perturbação, ingrediente essencial para a criação do comportamento irregular.

As perturbações que utilizamos têm uma única direção no espaço de fases. Isto limita muito o repertório de efeitos que elas podem causar. Diferentemente, as flutuações nos estados dos canais iônicos geram perturbações em todas as direções do espaço de fases. Desta maneira, imaginamos que os efeitos do ruído estocástico introduzido devido às flutuações estatísticas dos canais iônicos tenham um efeito ainda maior no comportamento dos neurônios, produzindo irregularidades bem maiores.

Estas observações nos levam à conclusão de que as perturbações estocásticas podem ter um papel na origem das irregularidades observadas em dados experimentais.

## **7.Resultados experimentais – redes neurais híbridas**

Realizamos experimentos com redes de inibição recíproca híbridas, compostas por um neurônio do gânglio estomatogástrico da lagosta *Panulirus interruptus* e um neurônio modelo simulado computacionalmente. As sinapses mútuas foram estabelecidas através do programa de fixação dinâmica de corrente DClamp (Pinto *et al.*, 2001).

Os dados foram obtidos durante um período de dois meses na Universidade da Califórnia, campus de San Diego, em colaboração com o Prof. Allen I. Selverston, um dos pioneiros no estudo do gânglio estomatogástrico dos crustáceos (Mulloney e Selverston, 1974; Selverston *et al.* 1976; Selverston e Moulins, 1987).

### ***7.1.Freqüência dos neurônios acoplados em função da condutância sináptica***

#### **7.1.1.Neurônios biológicos conectados a um neurônio HR**

A seguir mostramos os resultados obtidos acoplando um neurônio HR a neurônios VD e LP. A Fig. 7.88 mostra dados da freqüência de oscilação da rede em função da condutância sináptica obtidos em cinco experimentos diferentes. O neurônio biológico utilizado em cada experimento é identificado através da sua sigla na parte superior de cada gráfico. As curvas mostradas nestes gráficos podem ser entendidas como cortes verticais nos espaços

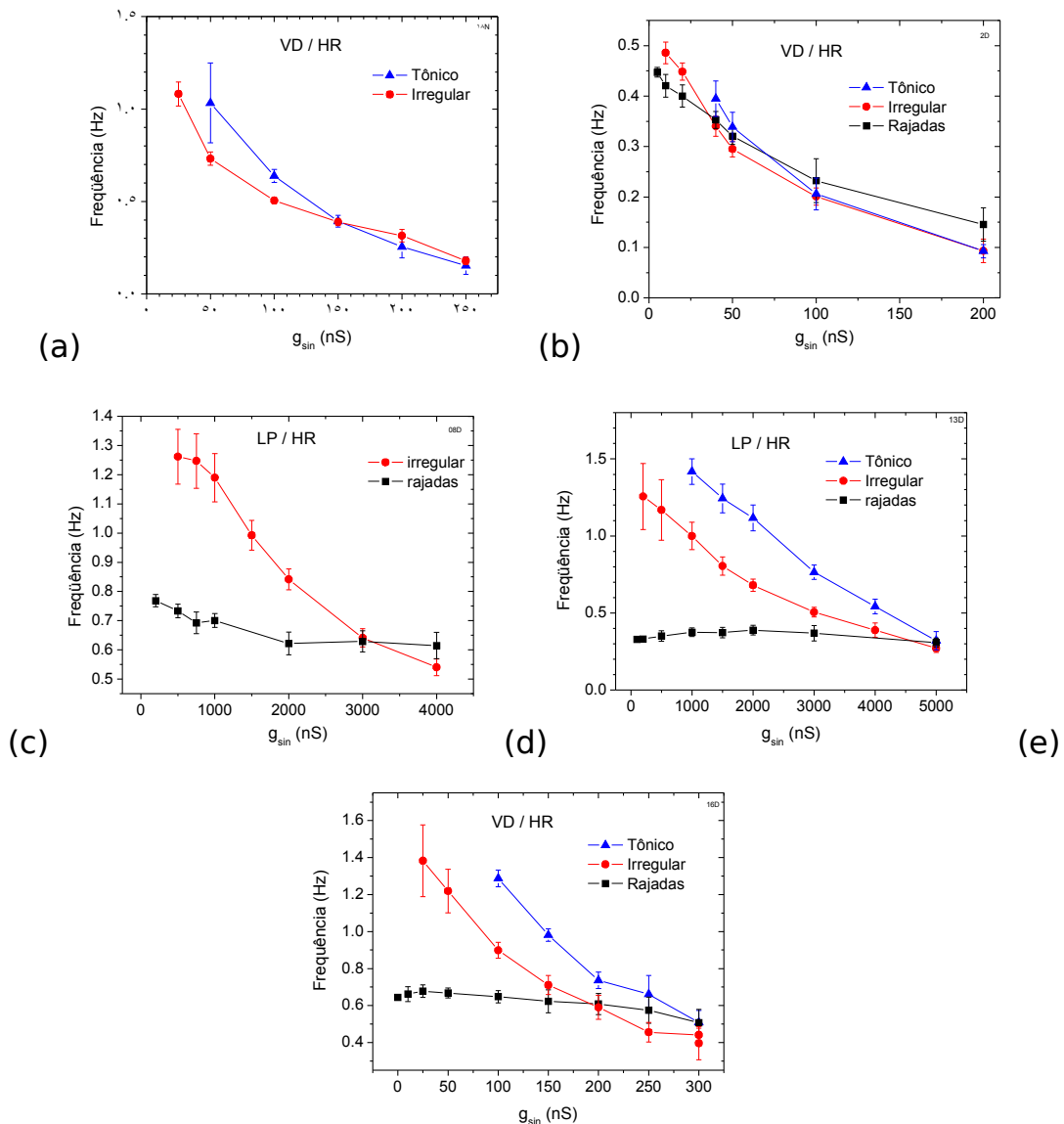
de parâmetros mostrados na seção 6.2.2, cada uma delas representando um tipo de comportamento intrínseco dos neurônios, em rajadas, caótico ou tônico.

Podemos observar que a rede modifica pouco a sua frequência quando os neurônios têm o comportamento em rajadas regulares (quadrados e linhas pretas). Já quando os neurônios têm comportamento caótico, a frequência varia mais do que quando os neurônios são regulares, mostrando que a rede se torna mais flexível. Finalmente, quando são intrinsecamente tônicos, os neurônios apresentam a maior flexibilidade dentre os três casos, variando mais a frequência para faixas mais estreitas de  $g_{sin}$ , entretanto a sincronização só ocorre para valores altos de  $g_{sin}$ . Estas observações são perfeitamente compatíveis com o que foi observado nas simulações numéricas.

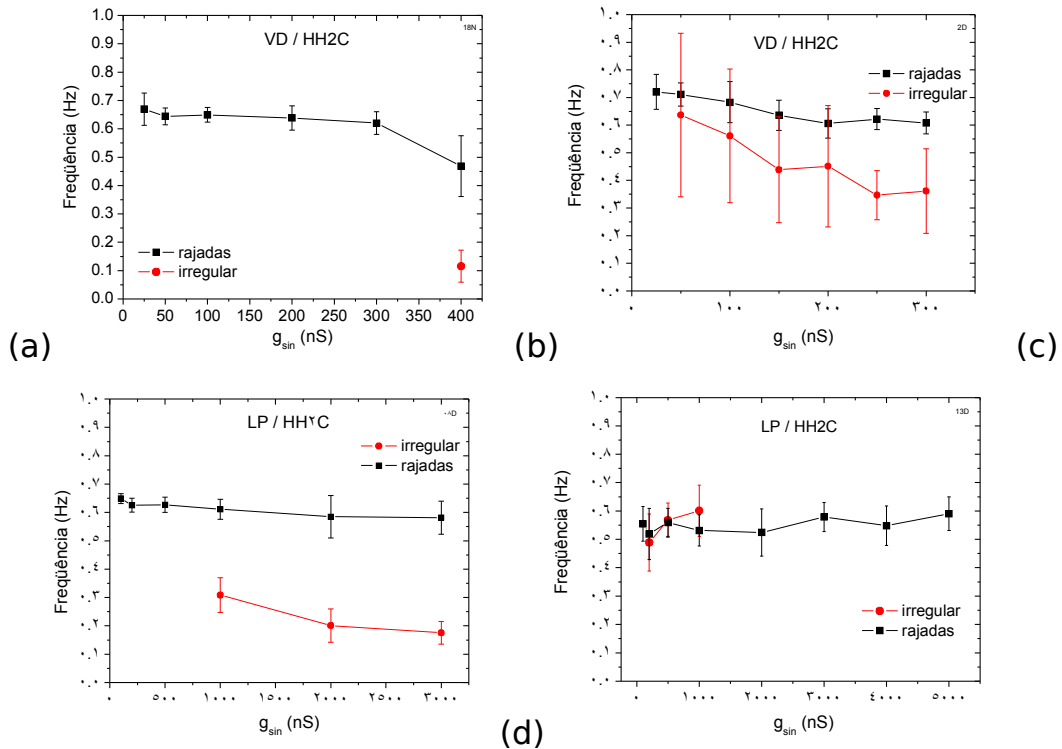
### **7.1.2. Neurônios biológicos conectados a neurônios HH2C**

Utilizando o mesmo procedimento experimental, realizamos experimentos com redes formadas por um neurônio biológico e um neurônio HH2C. Foram utilizados os mesmos neurônios biológicos dos usados nos experimentos com o modelo HR para possibilitar uma melhor comparação dos dados. A Fig. 7.89 mostra o resultado de quatro experimentos. Os gráficos de (a) até (d) foram obtidos a partir dos mesmos neurônios biológicos que produziram os resultados da Fig. 7.88(a) a (d), respectivamente.

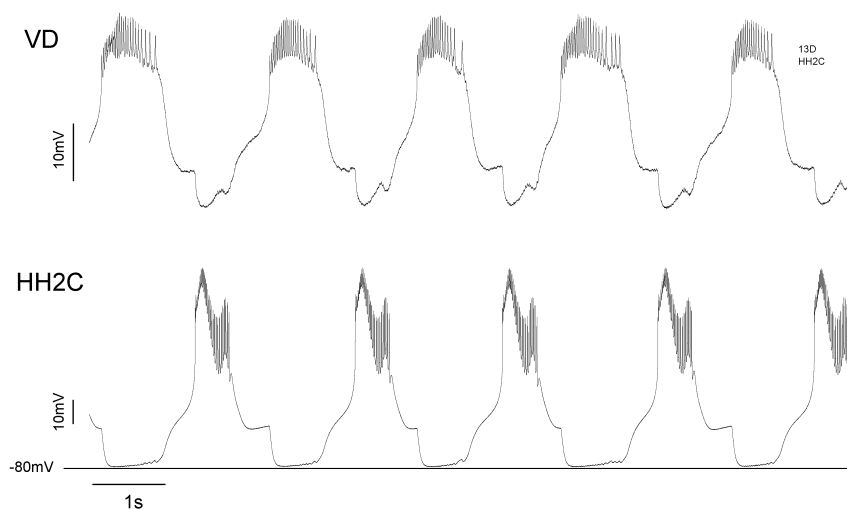
O comportamento intrínseco do modelo HH2C foi controlado através da modificação do parâmetro  $g_{KCa}$ .



**Fig. 7.88: Diversos dados da frequência de rajadas de um neurônio modelo HR conectado a um VD biológico. Quando os neurônios têm comportamento em rajadas a mudança da frequência é sempre inferior às outras situações. A faixa de frequências que a rede alcança é maior quando os neurônios são tônicos do que quando eles apresentam comportamento caótico. No entanto, quando os neurônios são caóticos, a sincronização ocorre para condutâncias sinápticas menores, mostrando uma estabilidade maior das séries temporais.**

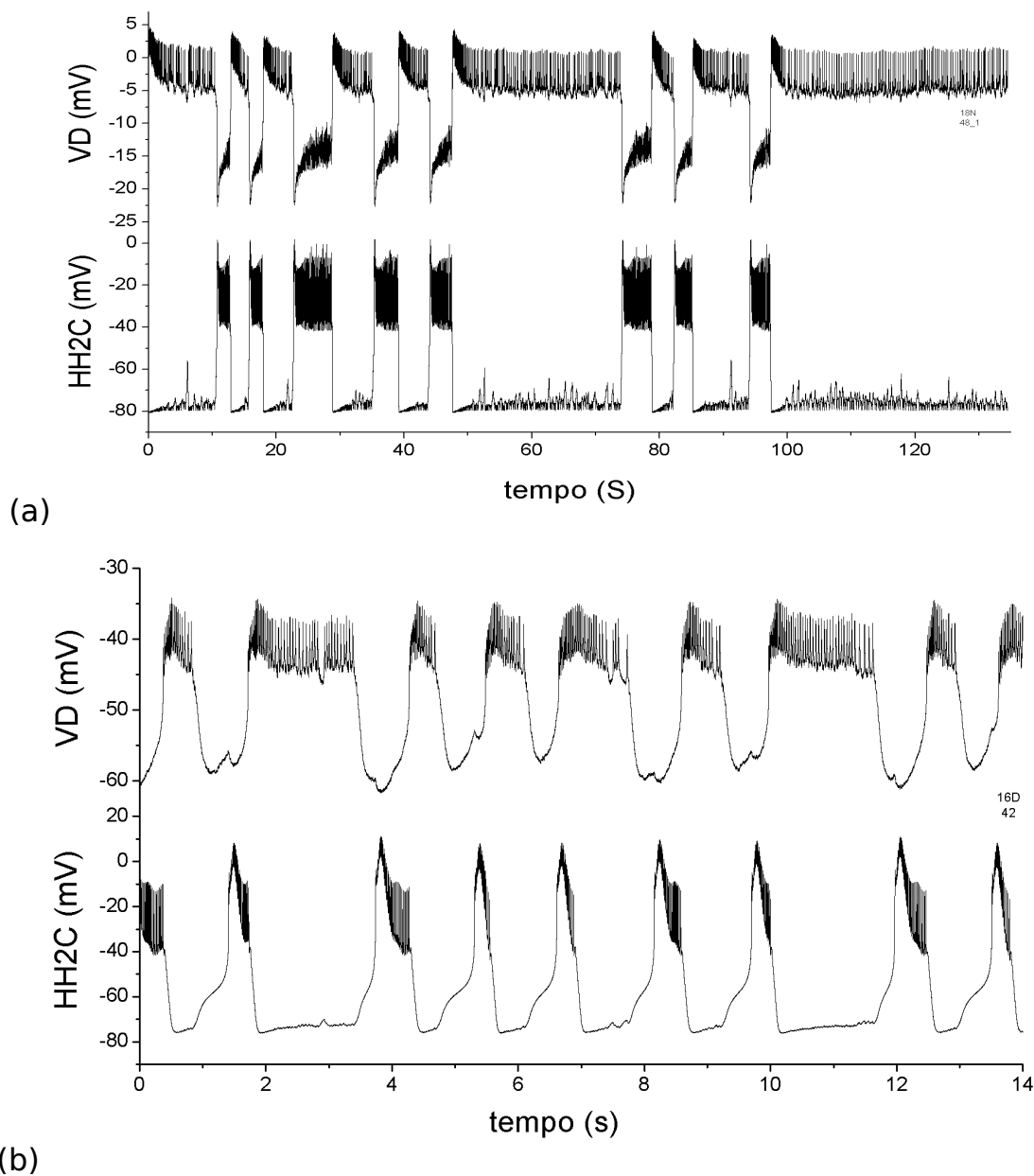


**Fig. 7.89: Medidas da freqüência de rajadas de uma rede para quatro experimentos. Em cada gráfico identificamos o neurônio biológico que compõe a rede juntamente com o neurônio HH2C. A curva em preto (vermelho) mostra os dados com o comportamento intrínseco dos neurônios em rajadas periódicas (tônico). Os pontos faltantes da curva vermelha mostram as séries temporais que não estabeleceram um comportamento em antifase. Quando o comportamento dos neurônios era tônico a rede não estabelecia um padrão oscilatório.**



**Fig. 7.90: Séries temporais de um neurônio VD (acima) acoplado a um neurônio HH2C. O comportamento intrínseco dos dois neurônios é em rajadas periódicas. A condutância sináptica entre eles é de 100nS. O comportamento dos neurônios é completamente sincronizado, porém é possível observar que o potencial de membrana do neurônio HH2C permanece muito próximo do potencial de reversão (-80mV) enquanto o outro neurônio dispara.**

Nestes dados experimentais há uma predominância muito grande de disparos do neurônio biológico. Como podemos observar na Fig. 7.90, a resposta do neurônio modelo à inibição sináptica é muito intensa, fazendo com que o modelo permaneça próximo do potencial de reversão durante quase todo o tempo em que é inibido. Neste caso, o comportamento oscilatório só acontece porque o neurônio biológico tem um comportamento individual em rajadas, liberando o neurônio modelo para o disparo. Para casos em que o neurônio biológico não apresenta hiperpolarizações suficientemente longas, são observados comportamentos bastante irregulares (Fig. 7.91).



**Fig. 7.91:** (a) Potenciais de membrana intracelulares de um neurônio VD conectado a um neurônio modelo HH2C quando a condutância sináptica é de (a) 400 nS e (b) 25nS. Em (a) o comportamento é bastante irregular e em (b) o neurônio VD determina completamente o comportamento do neurônio modelo que somente dispara quando o VD hiperpolariza.

A situação observada na Fig. 7.91 tem uma relação bastante estreita com o comportamento observado nos espaços de parâmetros obtidos com simulações numéricas para o modelo HH2C (seção 6.2.3). Nestas simulações os neurônios deixavam de oscilar



em antifase quando a duração das rajadas se tornava grande. Naquela seção, discutimos que o ritmo não podia ser estabelecido devido ao rebote fraco apresentado por este modelo. É o mesmo motivo que torna as séries temporais experimentais com o modelo HH2C instáveis. Para uma grande faixa de valores da condutância sináptica, quando o neurônio biológico dispara, o HH2C fica completamente inibido, e dispara somente quando o neurônio biológico hiperpolariza. Além disto, o efeito da inibição no neurônio modelo é nitidamente diferente do efeito sobre o neurônio biológico, mostrando uma resposta pouco realística à inibição.

Quando os neurônios se comportam em rajadas, observamos um pequeno decréscimo da frequência de oscilação da rede. Isto acontece pois o neurônio biológico permanece hiperpolarizado por um período um pouco maior do que faria se não estivesse acoplado, devido à inibição do HH2C (Fig. 7.91b). Porém, um ritmo constante é estabelecido: não há regularização do ritmo quando os neurônios são acoplados. Se o neurônio biológico tiver um comportamento intrínseco irregular, a rede também o terá, independentemente do comportamento intrínseco do neurônio modelo.

Em todos os experimentos, quando os neurônios eram colocados em comportamento tônico, o neurônio HH2C permanecia hiperpolarizado sem disparar em momento algum.

Em nenhum experimento observamos o neurônio modelo disparar e inibir permanentemente o neurônio biológico. Isto evidencia a assimetria entre o modelo HH2C e os neurônios biológicos. Estes últimos têm um rebote bastante forte e é necessária uma corrente muito forte para que eles permaneçam hiperpolarizados durante períodos longos.

Porém, ao fazer esta análise devemos levar em conta que não temos um controle completo do comportamento do neurônio através da injeção de corrente no soma. Isto acontece porque boa

parte das sinapses elétricas dos neurônios do STG é feita no neuropil, que é um prolongamento do corpo celular (Selverston e Moulins, 1987). Desta forma espera-se que injeções de corrente que modifiquem pouco a atividade neural sejam eficazes. Já correntes muito intensas podem não alterar o potencial de membrana de partes mais distantes do neuropil, devido a efeitos dissipativos. Neste caso podem ser observados comportamentos diferentes ao longo da extensão do neurônio incluindo a observação de disparos de potenciais de ação mesmo quando o potencial de membrana é bem inferior ao limiar de disparo. Os resultados mostrados neste trabalho correspondem a condições experimentais onde não foram observados estes comportamentos espúrios.

O fato de termos acesso somente ao soma dos neurônios representa uma grande limitação experimental, porém inevitável se quisermos observar o comportamento do neurônio biológico sem retirá-lo mecanicamente do tecido do STG. Uma alternativa para deixar a rede híbrida mais simétrica pode ser a introdução de modelos com mais compartimentos, que descrevam melhor estas diferenças do potencial ao longo da membrana neural.

Os resultados experimentais observados para os dois modelos são compatíveis com as simulações computacionais. Isto reforça a idéia de que a abordagem numérica pode ser muito instrutiva no entendimento destas pequenas redes neurais, revelando características importantes e auxiliando no entendimento das redes neurais biológicas.

As assimetrias observadas com as redes híbridas possibilitaram uma comparação dinâmica do comportamento dos neurônios modelo com os neurônios biológicos. As diferenças no comportamento dos dois neurônios na rede híbrida evidenciaram problemas no comportamento dinâmico do modelo HH2C que já haviam sido detectados nas simulações.

A observação dos dados experimentais teve também um papel importante na identificação do mecanismo pelo qual o comportamento dinâmico do modelo HH2C poderia ser melhorado, o que resultou no modelo HHIH.

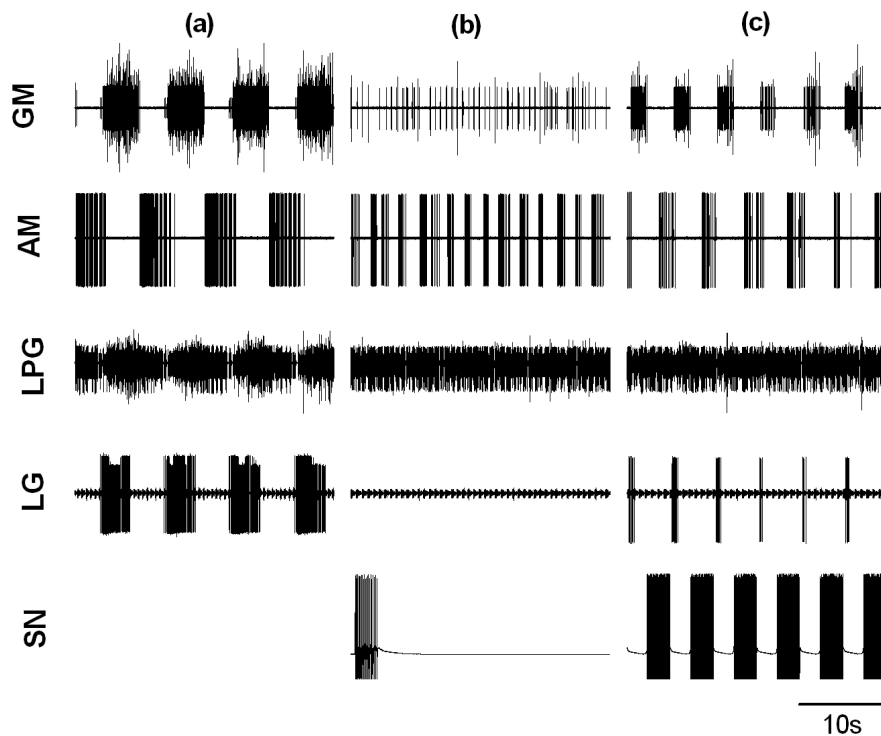
Não tivemos a oportunidade de realizar os experimentos com o novo modelo proposto. Contudo, os resultados experimentais e a excelente compatibilidade com os resultados numéricos nos levam a crer que o comportamento do modelo HHIH seria capaz de produzir padrões de oscilação muito mais parecidos com os produzidos pelos neurônios biológicos, tornando o comportamento coletivo da rede mais adequado. Esta constatação fica como uma proposta para trabalhos futuros.

## ***7.2. Restaurando o ritmo de um CPG gástrico de crustáceo usando o modelo SN***

Em colaboração com a Universidade da Califórnia em San Diego (Pinto *et al.*, 2004, resultados não publicados), foi proposto um experimento para tentar elucidar maiores detalhes sobre os mecanismos de geração de padrões no CPG gástrico (que não possui neurônios disparadores endógenos). Para a realização deste experimento foi necessário implementar um modelo de atividade neural que tivesse a característica de produzir uma salva de potenciais de ação em consequência de um pulso inibitório, mas que cessasse após algum tempo, fazendo com que o neurônio ficasse inativo novamente até uma nova inibição. Por isso desenvolvemos o modelo SN já descrito anteriormente (seção 5.1.1).

O protocolo de dynamic clamp modificado foi utilizado para conectar o neurônio modelo SN ao neurônio gástrico lateral (LG) do

CPG gástrico biológico com sinapses inibitórias mútuas. Alguns resultados deste experimento são mostrados na Fig. 7.92. Com o circuito intacto, o CPG gástrico produz um ritmo regular com período de  $\sim 5$  s. Após a produção de um dano nos nervos esofágicos inferiores (NEIs), que possuem aferentes moduladores do STG, o ritmo gástrico de mastigação cessa completamente. Entretanto, ao conectarmos SN e LG pelas sinapses inibitórias geradas por dynamic clamp estes passam a oscilar em antifase e o ritmo gástrico é reestabelecido na maioria dos neurônios do circuito gástrico, mostrando que o rebote pós inibitório é o grande responsável pelo ritmo no CPG gástrico.



**Fig. 7.92: Medidas extracelulares do neurônio SN conectado ao CPG gástrico. GM - neurônio da moela gástrica, AM - neurônio medial anterior, LPG - neurônio gástrico posterior lateral, LG - neurônio gástrico lateral, SN - neurônio modelo. (a) Atividade neural do circuito gástrico em condições normais (*in vitro*). (b) O ritmo gástrico é interrompido em razão do corte dos Nervos Esofágicos Inferiores (NEIs) que modulam a atividade do CPG. O neurônio LG para de disparar potenciais de ação, mas ainda apresenta rebote pós-inibitório (RPI). SN foi preparado para não disparar PAS após uma salva transiente (mostrada na figura) e para apresentar forte rebote pós-inibitório. (c) Conectando LG e SL através de sinapses inibitórias mútuas pelo Dynamic Clamp, estes dois neurônios passam a apresentar comportamento em antifase e o ritmo gástrico é restaurado na maioria das células do CPG biológico.**

## 8. Conclusão

A motivação deste trabalho foi o conjunto de evidências experimentais de que redes neurais biológicas como os CPGs, que produzem padrões periódicos, flexíveis e robustos, são formadas por neurônios que apresentam comportamento intrinsecamente caótico quando isolados de suas conexões sinápticas. A pergunta sobre quais as vantagens de usar elementos caóticos para produzir comportamento periódico levou vários autores a justificarem estas evidências enumerando algumas vantagens que a presença de comportamento caótico traria à sincronização do comportamento dos neurônios. Entretanto, na maioria dos casos, não foi discutido que as conexões sinápticas entre os neurônios constituem perturbações suficientemente fortes para destruir a dinâmica original dos neurônios isolados.

Procuramos estudar, de modo mais quantitativo, se existem vantagens do comportamento intrínseco dos neurônios ser caótico para o funcionamento adequado dos CPGs. Construimos modelos de CPGs simples usando diferentes modelos matemáticos de neurônios, cujo comportamento intrínseco foi modificado através de parâmetros de controle. Assim, nossa abordagem procurou encontrar de um modo geral, quais elementos intrínsecos da dinâmica dos neurônios isolados são responsáveis por produzir um comportamento coletivo flexível e robusto.

Utilizamos dois modelos bastante distintos para investigar esta questão: o modelo Hindmarsh-Rose (HR) que é um modelo fenomenológico simplificado do comportamento dinâmico neural e que não leva em conta condutâncias específicas da membrana celular; e um modelo baseado no formalismo de Hodgking-Huxley

(HH2C) cuja grande maioria dos parâmetros vem de medidas experimentais de condutâncias da membrana de neurônios do STG.

Em cada um dos modelos utilizamos um parâmetro de controle que modifica o comportamento intrínseco dos neurônios. No modelo HR foi utilizada uma corrente DC externa  $I$  e, no HH2C, alteramos a condutância máxima dos canais de potássio dependentes da concentração interna de cálcio ( $g_{KCa}$ ). Nos dois casos, os resultados obtidos com a alteração do parâmetro podem ser associados ao efeito de neuromoduladores. Os parâmetros foram escolhidos baseados no fato experimental de que o comportamento de um neurônio biológico do STG pode ser modificado continuamente de rajadas repetidas com baixa frequência até disparos tônicos de alta frequência (passando por comportamento caótico na transição) através da injeção de corrente DC ou da aplicação de substâncias neuromoduladoras presentes no STG *in vivo*.

Caracterizamos o comportamento dos neurônios modelo isolados nas transições entre comportamento em rajadas e tônico. Observamos que o modelo fenomenológico HR apresenta comportamento caótico para uma faixa grande de valores do parâmetro de controle  $I$  enquanto o modelo HH2C apresentou comportamento caótico para uma faixa estreita do parâmetro  $g_{KCa}$ .

Acoplamos os neurônios modelo em redes de inibição recíproca e em redes com três neurônios, observando o comportamento da rede em função de dois parâmetros, um que controla o comportamento intrínseco do modelo, descrito acima, e o outro que controla a intensidade máxima da condutância sináptica com que os neurônios estão acoplados.

As redes de inibição recíproca formadas por modelos HR se mostram bastante estáveis quando o comportamento intrínseco dos neurônios é em rajadas: os neurônios estabelecem um ritmo em

oposição de fase para qualquer valor do acoplamento sináptico dentro da faixa estudada. Entretanto, nesta mesma situação, a frequência da rede praticamente não se altera com a mudança do acoplamento sináptico, o que mostra que a rede é muito pouco flexível.

Ao mudarmos o parâmetro de controle, tornando tônico o comportamento intrínseco dos neurônios, observamos que a rede se torna muito mais flexível, variando bastante a sua frequência em função da condutância sináptica. Por outro lado, a rede se torna instável para valores baixos da condutância, ou seja, os neurônios não estabelecem um ritmo de oscilação em oposição de fases, devido à competição pelos disparos.

Definimos duas grandezas para quantificar a flexibilidade e a robustez das redes de inibição recíproca composta por neurônios HR e verificamos que a flexibilidade da rede aumenta em função do parâmetro  $I$ . Por outro lado, a robustez da rede diminui com o aumento de  $I$ . Assim, concluímos que o melhor balanço entre a flexibilidade e a robustez da rede ocorre quando os neurônios estão na transição entre o comportamento em rajadas e tônico. Observamos também que esta é a região onde existe uma grande suscetibilidade dos sistemas a apresentarem comportamento caótico. Desta forma, a razão de observarmos o comportamento caótico em neurônios isolados do CPG pilórico é a necessidade da rede apresentar comportamento flexível mas ao mesmo tempo robusto.

Redes compostas por três neurônios HR reproduziram o comportamento trifásico observado no CPG pilórico e também apresentaram um melhor balanço entre flexibilidade e robustez na transição entre comportamento em rajadas e tônico. Estas redes, por outro lado, apresentaram um comportamento instável para uma faixa grande do espaço de parâmetros. Identificamos que o forte



rebote que o modelo apresenta durante e após a inibição é o responsável pela instabilidade, o que é uma desvantagem do modelo HR quanto ao seu comportamento coletivo.

O modelo HH2C foi elaborado através da separação de um modelo original em dois compartimentos, o que proporcionou ao modelo uma melhor descrição do comportamento isolado dos neurônios disparadores endógenos em rajadas, passando a apresentar platôs e hiperpolarizações. Ao fazer esta separação, não é claro quais correntes devem ser incluídas em cada compartimento, principalmente pela falta de dados experimentais. A nossa proposta consistiu em separar as correntes rápidas que geram o potencial de ação das lentas que geram o platô e o comportamento em rajadas. Desta forma o modelo que propomos consiste basicamente dos seguintes compartimentos: um correspondente ao soma, no qual estão todas as correntes lentas; o outro corresponde a um axônio, responsável pelos potenciais de ação. Apesar de não termos medidas experimentais que justifiquem ou descartem esta escolha, o potencial de membrana do modelo isolado é bastante similar ao observado em dados experimentais.

Analisamos o modelo HH2C para construir as mesmas redes utilizadas para o modelo HR. Para as redes de inibição recíproca, o modelo HH2C se mostrou bastante insatisfatório com relação ao comportamento coletivo principalmente pelos seguintes fatores: (i) a dependência da frequência com relação à condutância sináptica é muito fraca e contrária à observada nos experimentos; (ii) a rede somente é capaz de estabelecer um padrão de oscilação em anti-fase quando os neurônios têm comportamento intrínseco em rajadas; (iii) quando estão próximos de se tornarem tônicos os neurônios não estabelecem um padrão de oscilação em anti-fase: quando um neurônio dispara, o outro é inibido permanentemente. Assim, mostramos evidências de que a inclusão de diversos

detalhes na atividade neural não necessariamente trazem benefícios para o comportamento coletivo.

Algumas das deficiências do modelo podem estar ligadas ao fato de que os neurônios utilizados nos experimentos foram mantidos em cultura, o que altera significativamente a expressão de canais iônicos e também o comportamento geral da célula. Além deste fator, o desenvolvimento do modelo foi feito para descrever o comportamento isolado dos neurônios sem a preocupação de descrever o comportamento dos mesmos quando acoplados. É importante destacar também que, grande parte da dificuldade de elaborar modelos satisfatórios para a atividade neural vem da complexidade exibida pelos neurônios, revelada pelos diversos mecanismos de adaptação destes às mudanças no meio em que estão imersos e pela grande quantidade de elementos (tais como canais iônicos, neuromoduladores, etc.) que se organizam para formar a atividade neural final.

As observações sobre o comportamento coletivo inadequado do modelo HH2C nos levou a propor uma modificação no modelo, aumentando seu rebote durante a inibição, através da potencialização da corrente  $I_H$ , originalmente baseada em medidas de neurônios do tálamo de vertebrados. Estas modificações melhoraram significativamente o comportamento coletivo exibido pelo modelo, que se aproximou mais do que havíamos observado para o modelo HR e dos resultados experimentais.

Realizamos experimentos com diferentes neurônios biológicos formando redes híbridas de inibição recíproca, onde um neurônio biológico é conectado através de sinapses artificiais a um neurônio modelo. Os resultados que obtivemos em todos os experimentos confirmaram os resultados obtidos nas simulações quanto à flexibilidade e robustez dos padrões rítmicos apresentados pela rede.

Os experimentos com redes híbridas constituíram uma maneira bastante adequada de testar os modelos de atividade neural em termos de suas propriedades dinâmicas coletivas, possibilitando a comparação em tempo real do comportamento do modelo com o do neurônio biológico. As diferentes respostas do modelo quando conectado ao neurônio biológico podem evidenciar eventuais falhas no modelo que não poderiam ser observadas através da análise do comportamento do modelo isolado, nem se este fosse conectado a modelos semelhantes.

De maneira geral, mostramos que a melhor relação entre as propriedades antagônicas flexibilidade e robustez é obtida, nos diversos modelos, na transição entre o comportamento isolado em rajadas e o disparo tônico e, é exatamente nesta transição que o comportamento caótico é observado nos diversos modelos. Além disso, verificamos que modelos biofisicamente plausíveis, mas limitados pelas próprias técnicas experimentais e pelas simplificações usadas em sua construção matemática, como ocorre com o HH2C, podem apresentar resultados de dinâmica coletiva piores que os obtidos com modelos fenomenológicos, como o HR. O modelo HH2C não apresenta robustez na transição entre disparos em rajadas ou tônico, já o HR é robusto nesta transição mas por apresentar rebote muito intenso não reproduz o comportamento plausível em redes com mais de dois neurônios. Desenvolvemos o modelo HHIH com rebote mais intenso que o HH2C e obtivemos, além da robustez na transição entre rajadas e disparos tônicos, resultados melhores e mais compatíveis com os observados em experimentos com neurônios do STG. Entretanto este modelo não chegou a ser testado em redes híbridas.

Analisamos a influência do parâmetro  $\tau_s$  que controla o tempo de decaimento da corrente pós-sináptica. Para isto utilizamos redes de inibição recíproca com neurônios modelo HR e observamos

como a mudança deste parâmetro altera a configuração das frequências de oscilação da rede observadas através do espaço de parâmetros. Constatamos que estas modificações são mais acentuadas nas regiões em que os neurônios são intrinsecamente tônicos e argumentamos que isto acontece devido ao aumento na taxa de disparo dos neurônios após a inibição. Introduzimos uma grandeza para estimar a corrente pós-sináptica média em função da taxa de disparo dos neurônios e do tempo de decaimento sináptico. Esta grandeza se mostrou satisfatória na previsão das situações em que a rede é mais sensível a mudanças no tempo de decaimento sináptico.

Elaboramos um modelo hipotético de atividade neural que não apresenta comportamento oscilatório intrínseco, mas que apresenta um forte rebote pós-inibitório. Investigamos o comportamento de uma rede de inibição recíproca formada por dois destes neurônios modelo e mostramos que esta rede é capaz de desempenhar oscilações em anti-fase, apresentando uma grande variação da frequência de oscilação e exibindo uma dependência do tipo lei de potências em relação ao parâmetro que controla a excitabilidade do neurônio. Utilizamos este modelo hipotético para restaurar o funcionamento de um CPG gástrico biológico danificado e mostrar que, neste CPG, o rebote pós-inibitório é um dos principais mecanismos de gênese do ritmo motor.

Finalmente, analisamos o comportamento de um modelo de alta dimensionalidade quanto a perturbações nas variáveis dinâmicas e mostramos que um comportamento similar à sensibilidade às condições iniciais pode ser observado simplesmente através da inclusão destas perturbações ao longo da trajetória do sistema, que originalmente se comportava apenas de maneira periódica.



## 9. Referências

- Abarbanel, H.D.I., Huerta R., Rabinovich M.I., Rulkov N.F., Rowat, P.F., Selverston, A.I. (1996). Synchronized action of synaptically coupled chaotic model neurons, *Neural Computation* 8 (8): 1567-1602.
- Abraham R.H. e Shaw C. (1992). *Dynamics, the geometry of behavior*, Addison-Wesley, RedWood City.
- Abbott L.F. e Marder E., *Modeling small networks*. Em: *Methods in neuronal modeling* (2nd ed.), edited by Koch C and Segev I., Cambridge, MA, MIT Press (1998), p. 361–410.
- Alligood, K.T., Sauer T.D. e Yorke, J.A. (1997), *Chaos an introduction to dynamical systems*, Springer-Verlag, New York.
- Argyris J., Faust G. e Haase M. (1994). *An exploration of the chaos*, Elsevier Science B.V., Amsterdam.
- Baptista M., Reyes M.B., Sartorelli J.C., Grebogi C. e Rosa E. (2003). Communication-based on topology preservation of chaotic dynamics, *Int. J. Bif. Chaos* 13(9), 2551-2560.
- Bear M.F., Connors B.W. e Paradiso M.A., *Neurociências: Desvendando o sistema nervoso*, Artmed Editora S/A, Porto Alegre, 2a. ed. (2002).
- Brown T. G. (1911). The intrinsic factors in the act of progression in the mammal, *Poc. Roy. Soc. Lond. B* 84: 308-319.
- Bushholtz F., Golowasch J., Epstein I.R. e Marder E. (1992), *Mathematical Model of Identified Stomatogastric Ganglion Neuron*, *J. Neurophysiology* 67, 332-340.
- Cvitanovic P. (1989), *Universality in chaos*, 2a ed., IOP Ltd, Bristol e Philadelphia.
- Destexhe, A., e Marder, E. (2004): Plasticity in single neuron and circuit computations, *Nature* 431, 789.
- Destexhe A., Mainen Z.F., Sejnowski T.J. (1994): An efficient method for computing synaptic conductances based on a kinetic-model of receptor-binding, *Neural Computation* 6 (1) 14-18.
- Elson R.C., Selverston A.I., Abarbanel H.D. I. e Rabinovich M. I. (2002), Inhibitory Synchronization of Bursting in Biological Neurons: Dependence on Synaptic Time Constant, *J. Neurophysiol.* 88, 1166–1176.
- Falcke, M., Huerta, R., Rabinovich, M., I., Abarbanel, H., D., I., Elson, A., R., C. e Selverston, A. (2000). Modeling observed chaotic oscillations in bursting neurons: the role of calcium dynamics and ip3, *Biological Cybernetics* 82(6), 517-527.
- Game, C.J.A. (1982). BVP models of nerve membrane, *Nature* 299, 375.
- Glass, L. (1995) *Chaos in neural systems*. In *The Handbook of Brain Theory and Neural Networks*, M.A. Arbib, Ed. MIT Press, Cambridge, MA, 186-189.
- Golowasch J., Marder E. (1992). Ionic currents of the lateral pyloric neuron of the stomatogastric ganglion of the crab, *J. of Neurophysiology* 67 (2): 318-331.
- Grégoire N., Prigogine I. (1989), *Exploring Complexity*, W.H. Freeman and Company, New York.

- Guckenheimer J. e Oliva R.A. (2002): Chaos in the Hodgkin-Huxley Model, *SIAM J. Applied Dynamical Systems* 1 (1), 105-114.
- Guckenheimer J., Harris-Warrick R, Peck J. e Willms A. (1997), Bifurcation, bursting, and spike frequency adaptation *J. Computational Neuroscience*, 4(3), 257-277.
- Harris-Warrick R.M. e Marder E. (1991), Modulation of neural networks for behavior, *Annu. Rev. Neurosci.* 14, 39-57.
- Harris-Warrick, R. M., Nagy, F., Nusbaum, M. P. (1992): Modulation of stomatogastric networks by identified neurons and transmitters. Em: *Dynamic Biological Networks: The Stomatogastric Nervous System*, eds. Harris-Warrick, R. M. *et al.*, MIT Press, Cambridge, MA.
- Harris-Warrick R.M., Coniglio M., Levini R.M., Gueron S. e Guckenheimer J. (1995), Dopamine modulations of two subthreshold currents produces phase shifts in activity of an identified motoneuron, *J. Neurophysiol.* 74, 1404-1420
- Hindmarsh J. L. e Rose R. M. (1984): A model of neuronal bursting using three coupled first order differential equations, *Proc. R. Soc. Lond. B.* 221, 87-102.
- Hindmarsh J.L. e Rose R.M. (1982), A model of the nerve impulse using two first-order differential equations, *Nature* 296, 162.
- 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.
- Hodgkin A.L. (1948), The local electric changes associated with repetitive action in a non-medulated axon, *J. Physiol.* 107, 165-181.
- Marder, E. 1998: From Biophysics to models of network function, *Annu. Rev. Neurosci.* 21, 25-45.
- Holden, A.V. e Fan, Y. (1992a) From Simple to complex oscillatory behaviour via intermittent chaos in the Rose-Hindmarsh model for neuronal activity. *Chaos, Solitons and Fractals* 2(4), 349-369.
- Holden, A.V. e Fan, Y. (1992b) From Simple to simple bursting oscillatory behaviour via chaos in the Rose-Hindmarsh model for neuronal activity. *Chaos, Solitons and Fractals* 2 (3), 221-236.
- Huguenard J. R., McCormick, D. A. (1992), Simulation of the currents involved in rhythmic oscillations in thalamic relay neurons. *J Neurophysiol* 68, 1373–1383.
- Izhikevich E.M. (2000), Neural Excitability, spiking and bursting, *Int. J. Bif. Chaos* 10(6), 1171-1266.
- Jacklet J.W. (1989). *Neuronal and cellular oscillators*, Dekker, New York.
- Kandel E.R., Schwartz J.H., e Jessel T.M. (2003). *Princípios da neurociência*, Ed. Manole, Barueri.
- Kandel E.R., Schwartz J.H., e Jessel T.M. (1991): *Principles of Neural Science*, 3<sup>rd</sup> ed., Appleton & Lange, Connecticut.
- Kiehn O. e Harris-Warrick R.M. (1992). 5-HT modulation of hyperpolarization-activated inward current and calcium-dependent outward current in a crustacean motor neuron, *J. Neurophysiol.* 68:496 –508.
- Levitan I.B., Kaczmareck L.K., *The Neuron*, Oxford University Press, New York (1997).

- Liu Z, Golowasch J, Marder E e Abbott LF (1998) A model neuron with activity-dependent conductances regulated by multiple calcium sensors. *J. Neurosci.* 18:2309–2320.
- Llinás R. R. (1988). The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insights into central nervous system function. *Science* 242: 1654-1664.
- Marder E. (1998), From biophysics to models of network function, *Annu. Rev. Neurosci.* 21, 25-45.
- Miller J.P. e Selverston A.I. (1979). Rapid killing of single neurons by irradiation of intracellularly injected dye. *Science* 206, 702-704.
- Morris C., Lecar H. (1981), Voltage oscillations in the barnacle giant muscle fiber, *Biophys. J.* 35, 193-213.
- Mulloney, B., Selverston, A. I. (1974): Organization of the stomatogastric ganglion of the spiny lobster, *J. Comp. Physiol.* 91, 1-32.
- Nadim F., Manor Y., Kopell N. e Marder E. (1999). Synaptic depression creates a switch that controls the frequency of an oscillatory circuit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 8206–8211.
- Nowotny T. (2004), comunicação particular, dados não publicados.
- Nusse H.A., Yorke J.A. (1998): *Dynamics: numerical exploration*, 2a edição, Springer, New York.
- Pinto R.D., Elson R.C., Szucs 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(1), 39-48
- 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.
- Prinz A.A., Thirumalai V., e Marder E. (2003a): The Functional Consequences of Changes in the Strength and Duration of Synaptic Inputs to Oscillatory Neurons, *The Journal of Neuroscience* 23(3), 943–954.
- Prinz A. A., Billimoria, C.P. e Marder E. (2003b). Alternative to Hand-Tuning Conductance-Based Models: Construction and Analysis of Databases of Model Neurons, *J. Neurophysiol.* 90: 3998–4015
- Prinz A.A., Bucher, D. e Marder, E.(2004): Similar network activity from disparate circuit parameters, *Nature Neuroscience* 7(12), 1345.
- Rabinder N.M., Chua's circuit: A paradigm for chaos, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore (1993).
- Rabinovich M.I., Varona P., Selverston A.I., Abarbanel H.D.I. (2005). *Dynamical Principles in Neuroscience*, submetido à *Rev. Mod. Phys.*
- Rowat P.F., Elson R.C. (2004), State-dependent of Na channel noise on neuronal burst generation, *J. Comput. Neurosci.* 16, 87-112.
- Sauer T. (1994): Reconstruction of dynamical systems from interspike intervals, *Phys. Rev. Lett.* 72, 3811.
- Selverston A.I., Rabinovich M.I., Abarbanel H.D.I., Elson R., Szucs A., Pinto R.D., Huerta R., Varona P. (2000), Reliable circuits from irregular neurons: A dynamical approach to understanding central pattern generators, *J. PHYSIOLOGY-PARIS* 94 (5-6), 357-374.



- Selverston A.I., Moulins M., The crustacean stomatogastric system, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (1987).
- Selverston A.,I., Russell D.,F., Miller J.,P., e King D.,G. ( 1976): The stomatogastric nervous system: structure and function of a small neural network. Prog. Neurobiol. 7: 215–290.
- Sharp, A.A., Skinner, F.K. e Marder, E.(1996): Mechanisms of Oscillation in Dynamic Clamp Constructed Two-Cell Half-Center Circuits, J. Neurophys. 76(2), 867.
- Sharp A.A., O’Neil M.B., Abbott L.F. e Marder E.(1993). Dynamic clamp: computer-generated conductances in real neurons, J. Neurophysiol. 69, 992–995.
- Skinner F., K., Sharp, A., A. e Marder E. (1994): Reciprocally inhibitory neural networks: effects of variations in synaptic parameters, Soc. Neurosci. Abstr. 20, 1413.
- Still S, Masson G. Le (1999), Travelling waves in a ring of three inhibitory coupled model neurons, Neurocomputing 26-27, 533-539.
- Takens F. (1981), Detecting strange attractors in turbulence, Lecture Notes in Mathematics 898, Springer Verlag.
- Turrigiano G., LeMasson G. e Marder E. (1995), Selective regulation of current densities underlies spontaneous changes in the activity of cultured neurons, The Journal of Neuroscience 15(5), 3640-3652.
- Varona, P., Torres, J., J., Huerta, R., Abarbanel, H., D., I., Rabinovich, M., I. (2001) Regularization mechanisms of spiking-bursting neurons, Neural Networks 14, 865-875.
- White J., Budde T., e Kay A.R. (2000), Channel noise in neurons. Trends Neurosci. 23(3), 131-137.
- Zhang Y., Oliva R., Gisselmann G., Hatt H., Guckenheimer J. e Harris-Warrick R.M. (2003), Overexpression of a hyperpolarization-activated cation current ( $I_h$ ) channel gene modifies the firing activity of identified motor neuron in a small neural network, The Journal of Neuroscience 23(27), 9059-9067.

## 10.Apêndices

### A. Listagem da biblioteca BiblComumRK6.h e da rotina de integração através do método de Runge-Kutta de 6ª ordem com passo adaptativo

```

/*****
BiblComumRK6.h
Biblioteca compartilhada entre o programa principal e
a rotina que integra as equações diferenciais
*****/

#define DIM 14 //Ajustar de acordo com a dimensão do modelo de neurônio
static double TOLERANCE=1.0e-15;
int RK6Adapt(double *,double ,double *,double *,
             void (*)(double,double*,double*));

//fim da BiblComumRK6.h

//-----
//RK6Adapt1.0.cpp
//-----

#include "BiblComumRK6.h"
//#include "ExChamaRK6.h"
#include <math.h>
#include <stdio.h>
#include <stddef.h>
#include <stdlib.h>
#define ABS( X ) (((X)>0.0)?(X):- (X))
#define MMAX(X,Y) (((X)>(Y))?(X):(Y))
#define MMIN(X,Y) (((X)<(Y))?(X):(Y))
#define ABSERR 1e-15
/* frame time interval */
#define FRAME_INCT 1
#define NR_END 1

double *dvector(long, long);
void nrerror(char []);
//float **matrix(long,long,long,long);
void funcao(double ,double *,double *);

int intey(double ,double ,double *,double ,double *,void (*)(double,double*,double*));
double inct=1.0e-6; //1e-6 //para este programa funcionar no windows tive que colocar
o inct para 1e-2
//double TOLERANCE=1.0e-6;
double SS=0.;
double trecor=0.;
//-----

int RK6Adapt(double *variables,double time,double *dt,double *TakenDt,void (*funcao)
(double, double*,double*)){}

```

```

long j;
inct=*dt;
double variables_loc[DIM];
for(j=0;j<DIM;++j) variables_loc[j]=variables[j];
while (intey(time,inct,variables,TOLERANCE,&SS,funcion)) {
    inct=MMAX(SS,0.25*inct);
    for(j=0;j<DIM;++j) variables[j]=variables_loc[j];
}
*TakenDt=inct;
inct=MMIN(SS,4.0*inct);
inct=MMIN(inct,FRAME_INCT);
*dt=inct;
free(variables_loc);
return(0);
}

/*=====*/
/*=====*/
/* New integration routine, more powerfull 1,4 */

int intey(double tiempo,double inc_integracion,double *variables,double tol,double
*SS,void (*funcion)(double,double*,double*))
{
    static double apoyo[DIM],retorno[DIM],variables_hat[DIM];
    static double k[6][DIM];

    double u=0.0,u_y=0.0;
    int j;
    //double kk[6][DIM];
    //double apoyo[DIM];

    funcion(tiempo,variables,retorno);
    for(j=0;j<DIM;++j) k[0][j]=inc_integracion*retorno[j];
    for(j=0;j<DIM;++j) apoyo[j]=variables[j]+k[0][j]*.2;

    funcion(tiempo+inc_integracion/5,apoyo,retorno);

    for(j=0;j<DIM;++j) k[1][j]=inc_integracion*retorno[j];
    for(j=0;j<DIM;++j) apoyo[j]=variables[j]+k[0][j]*.075+k[1][j]*0.225;

    funcion(tiempo+inc_integracion*0.3,apoyo,retorno);
    for(j=0;j<DIM;++j) k[2][j]=inc_integracion*retorno[j];
    for(j=0;j<DIM;++j) apoyo[j]=variables[j]+k[0][j]*.3-k[1][j]*0.9+k[2][j]*1.2;
    funcion(tiempo+inc_integracion*0.6,apoyo,retorno);
    for(j=0;j<DIM;++j) k[3][j]=inc_integracion*retorno[j];
    for(j=0;j<DIM;++j) apoyo[j]=variables[j]+k[0][j]*0.075+k[1][j]*0.675-k[2][j]*0.6+k[3][j]*0.75;

    funcion(tiempo+inc_integracion*0.9,apoyo,retorno);
    for(j=0;j<DIM;++j) k[4][j]=inc_integracion*retorno[j];
    for(j=0;j<DIM;++j) apoyo[j]=variables[j]+k[0][j]*0.660493827160493
        +k[1][j]*2.5
        -k[2][j]*5.185185185185185
        +k[3][j]*3.888888888888889
        -k[4][j]*0.864197530864197;
    funcion(tiempo+inc_integracion,apoyo,retorno);
    for(j=0;j<DIM;++j) k[5][j]=inc_integracion*retorno[j];

    for(j=0;j<DIM;++j) variables_hat[j]=variables[j]+k[0][j]*0.1049382716049382+
        k[2][j]*0.3703703703703703+
        k[3][j]*0.2777777777777777+

        k[4][j]*0.2469135802469135;

    for(j=0;j<DIM;++j) variables[j]+=k[0][j]*0.098765432098765+

```

```

        k[2][j]*0.396825396825396+
        k[3][j]*0.231481481481481+
        k[4][j]*0.308641975308641-
        k[5][j]*0.035714285714285;

for(j=0;j<DIM;++j) {
    u+=ABS(variables[j]-variables_hat[j]);
    u_y+=ABS(variables[j]);
}

u=u/(double)DIM;
u_y=u_y/(double)DIM;
u_y=u_y*tol+ABSERR;

if(u>1.0e-20) *SS=0.9*inc_integracion*pow(u_y/u,.14285714285714285714);
else *SS = 10.0*inc_integracion;

if (u<u_y) return 0; else return 1;

}

/*=====*/
/*=====*/

float **matrix(long nrl, long nrh, long ncl, long nch)
    /* allocate a float matrix with subscript range m[nrl..nrh][ncl..nch] */
{
    long i, nrow=nrh-nrl+1,ncol=nch-ncl+1;
    float **m;

    /* allocate pointers to rows */
    m=(float **) malloc((size_t)((nrow+NR_END)*sizeof(float*)));
    if (!m) nrerror("allocation failure 1 in matrix()");
    m += NR_END;
    m -= nrl;

    /* allocate rows and set pointers to them */
    m[nrl]=(float *) malloc((size_t)((nrow*ncol+NR_END)*sizeof(float)));
    if (!m[nrl]) nrerror("allocation failure 2 in matrix()");
    m[nrl] += NR_END;
    m[nrl] -= ncl;

    for(i=nrl+1;i<=nrh;i++) m[i]=m[i-1]+ncol;

    /* return pointer to array of pointers to rows */
    return m;
}

/*=====*/
/*=====*/
void nrerror(char error_text[])
    /* Numerical Recipes standard error handler */
{
    fprintf(stderr,"Numerical Recipes run-time error...\n");
    fprintf(stderr,"%s\n",error_text);
    fprintf(stderr,"...now exiting to system...\n");
    exit(1);
}

double *dvector(long nl, long nh)
    /* allocate a double vector with subscript range v[nl..nh] */

```

```

{
    double *v;

    v=(double *)malloc((size_t) ((nh-nl+1+NR_END)*sizeof(double)));
    if (!v) nrerror("allocation failure in dvector()");
    return v-nl+NR_END;

}

float *vector(long nl, long nh)
    /* allocate a float vector with subscript range v[nl..nh] */
{
    float *v;

    v=(float *)malloc((size_t) ((nh-nl+1+NR_END)*sizeof(float)));
    if (!v) nrerror("allocation failure in vector()");
    return v-nl+NR_END;
}

double **dmatrix(long nrl, long nrh, long ncl, long nch)
    /* allocate a double matrix with subscript range m[nrl..nrh][ncl..nch] */
{
    long i, nrow=nrh-nrl+1, ncol=nch-ncl+1;
    double **m;

    /* allocate pointers to rows */
    m=(double **) malloc((size_t) ((nrow+NR_END)*sizeof(double*)));
    if (!m) nrerror("allocation failure 1 in matrix()");

    m += NR_END;
    m -= nrl;

    /* allocate rows and set pointers to them */
    m[nrl]=(double *) malloc((size_t) ((nrow*ncol+NR_END)*sizeof(double)));
    if (!m[nrl]) nrerror("allocation failure 2 in matrix()");
    m[nrl] += NR_END;
    m[nrl] -= ncl;

    for(i=nrl+1;i<=nrh;i++) m[i]=m[i-1]+ncol;

    /* return pointer to array of pointers to rows */
    return m;
}

int *ivector(long nl, long nh)
    /* allocate an int vector with subscript range v[nl..nh] */
{
    int *v;

    v=(int *)malloc((size_t) ((nh-nl+1+NR_END)*sizeof(int)));
    if (!v) nrerror("allocation failure in ivector()");
    return v-nl+NR_END;
}

```

## B. Listagem do programa de análise dos dados experimentais

```

//-----
//Analise.c

```

```

/*****/
/* Programa análise de dados de experimentos acoplando um neu biológico*/
/* com um neuronio in silico.
/* Marcelo Bussotti Reyes - Instituto de Física da Universidade de São Paulo*/
/* Fevereiro/2005
/*****/
#include <vcl.h>
#include <math.h>
#include <stdio.h>
#include <stdlib.h>
#include <time.h>
#include <ctype.h>
#include <string.h>
#include <math.h>
#include <conio.h>
// #include <SysUtils.h>

#define NumNeus 2 //represents the number of neurons in the network
// #define DIMTOT DIM+2
#define M 2 //maximo número de medidas de um mesmo neuronio
#define N_MEDIA 30 //pontos utilizados para fazer a média dos pontos para
//atenuar problemas com ruídos experimentais
#define DIM M*NumNeus //DIM is the number of 1st order autonomous
//differential equations
#define scale 1.0 //proportionality factor between integr. step and real time
//um passo em segundos é igual a dt/scale
// In Mischa model dt(real)=dt(integration)/1000

#define save 0
#define rpt 1
#define CyclicIC 0

#define ABS( X ) (((X)>0.0)?(X):-(X))
#define MMAX(X,Y) (((X)>(Y))?(X):(Y))
#define MMIN(X,Y) (((X)<(Y))?(X):(Y))
#define ABSERR 1e-15
#define FRAME_INCT 1
#define NR_END 1

#define EXTRACEL 1 //ÍNDICE DO SINAL EXTRACELULAR
#define MODEL 0 //índice do potencial do neuronio modelo
#define BIOL 1 //índice do neurônio biológico
#define INTRACEL 0 //extracelular
#define V 0

#define gsyn 0
#define taus 1
#define Sinf 2
#define Ssyn 3

void funcao(double tiempo,double *,double *);
double corrente_sinaptica(double *, double , double , double );
int intey(double ,double ,double *,double ,double *,double *, double *,
double *, double **,double );
double sigmoid(double Vs, double V_desl,double Incl);
int findpeak(double,double *);
int period_check(double *,int,int,double);
int principal();
float ContaSpikesPorBurst(double*,int,double);
void stat(double **media*/,double**std*/, double**vet*/, int/*num*/);
double *dvector(long nl, long nh);
double **dmatrix(long nrl, long nrh, long ncl, long nch);
double MtxSyn[NumNeus][NumNeus][4];
void DeslocaVetor (double*);

double x[NumNeus][M];
double xprev[NumNeus][M];
double xpost[NumNeus][M];
double Ic[NumNeus][NumNeus];
double TOLERANCE=1.e-6;
double SS = 0.0;
//void nrerror(char []);
/*****/

double Itot[NumNeus];//={0.0; //Itot is the total synaptic current entering
//the neuron [index]

```

```

double I=0.0;
double Ii[NumNeus] = {3.14,3.14};
double Ip;
int contmin[NumNeus];
double avefreq[NumNeus],stdfreq[NumNeus];
double ave_curr[NumNeus];
double gp=0.0;
int prddisp; //this saves the period on burst sequence
int Neu;
double Spb[NumNeus];

double aveISI[NumNeus],stdISI[NumNeus];
double avefase[NumNeus],stdfase[NumNeus];
void Roda(void);

double trigger[NumNeus]={-12.0,-8.0};
double SpkTrigger[NumNeus] = {4.0,.90};

FILE *ps,*ExprData;
int prd;
char name[20],number[20],data[10];

int main(void){
    int i,j,Am,AM;
    char nome[10];
    char lixo[100];
    float aux;
    printf("Arquivo menor: ");
    scanf("%d",&Am);
    printf("Arquivo maior: ");
    scanf("%d",&AM);

    if((ps=fopen("paraspc.dat","a"))==NULL){
        printf("Couldn't read paraspc.dat\n");
        exit(0);
    }
    fprintf(ps,"identif ");
    for(i=0;i<NumNeus;i++){
        fprintf(ps,"cont%d ave%d std%d Spb%d AveISI%d
                stdISI%d avefase%d stdfase%d ",
                i,i,i,i,i,i,i,i);
    }
    fprintf(ps,"prddisp \n");

    for(j=Am;j<=AM;j++){
        {
            for(int k = 0;k<20;k++){

                if(k==0) sprintf(nome,"%d.atf",j);
                else sprintf(nome,"%d_%d.atf",j,k);
                aux = (float)j+0.01*(float)k;
                printf("\ntentando abrir %s: ",nome);

                if((ExprData=fopen(nome,"r"))==NULL){
                    printf("Couldn't read file\n");
                    //exit(0);
                }
                else{
                    printf("ok\n");
                    //Elimina o cabeçalho
                    for(i=0;i<31;i++){
                        fscanf(ExprData,"%s",&lixo);
                        printf("%s ",lixo);
                    }//cabeçalho eliminado
                    printf("\n\n");

                    prd=principal();

                    fprintf(ps,"%f ",aux);
                    for(int i=0;i<NumNeus;i++){
                        fprintf(ps,"%d %e %.2e %lf %e %e %.2e %lf %.2e ",

```

```

        contmin[i],avefreq[i],stdfreq[i],
        Spb[i],aveISI[i],stdISI[i],
        avefase[i],stdfase[i]);
    }
    fprintf(ps,"%d\n",prddisp);
    fflush(ps);
    //-----

    printf("\n");
    printf("%d\n",prd);
}
}
}
fclose(ps);
}
/*****
int principal(){
    FILE *fp,*fp1,*fp2,*ret;
    FILE *freqfile;
    double prevtime[NumNeus],tempo=0.0;

    //ajustar estes parametros

    double freq[NumNeus][1000],sum,fase[NumNeus][100];
    double derivant[NumNeus],deriv[NumNeus],prevpeak[NumNeus];
    double isi[NumNeus][10000];
    double sum_itot[NumNeus];//=0.0;
    float meanspike=10.0;
    double disp[500];//used double to take advantage of the function period_check
    int contdisp=-1; //used to map the burst sequence (hiperpolir. seq)
    int rtrn;
    int prd_hip;
    long int sum_itot_count[NumNeus];//=0;
    unsigned long int tc;
    int i,j,pre,pos,triggerflag[NumNeus];
    int indexpeak[NumNeus];
    time_t t; //used to estimate the time for running the program
    bool FlagSpk[NumNeus] = {true,true};
    double FrameSpk[NumNeus] = {0.,0.};
    t=time(NULL);
    bool sai = false;
    double lixo=0.0;
    int ans;

    double HxBE[2*N_MEDIA+1],Htempo[2*N_MEDIA+1],
           HxMV[2*N_MEDIA+1],HxBV[2*N_MEDIA+1];//historia das variaveis
           // xME[i] = xMI[i];

    for(i=0;i<NumNeus;i++){ //Iniciates the synaptic variables
        derivant[i]=0;
        deriv[i]=1;
        triggerflag[i]=0;//mudei aqui para zero, antes era 1
        prevtime[i]=0;
        prevpeak[i]=0.0;
        contmin[i]=0;//-1;
        sum_itot[i]=0.0;
        indexpeak[i]=0;
    }

    /*****
    //open files to write dynamical variables
    /*
    if((fp=fopen("teste.dat","w"))==NULL){ //file for membrane potentials
        printf("Couldn't create file\nprogram aborted\n");
        exit(1);
    }
    /**/
    printf("same parameters? (1=yes)");
    scanf("%s",&ans);
    if(ans!=1){
        printf("\nThreshold for spike detection for model neuron: ");
        scanf("%lf",&SpkTrigger[0]);
        printf("\nThreshold for spike detection for biologic neuron: ");
        scanf("%lf",&SpkTrigger[1]);

```



```

printf("\nThreshold for hyperpolarization detection for model neuron: ");
scanf("%lf",&trigger[0]);
printf("\nThreshold for hyperpolarization e detection for model neuron: ");
scanf("%lf",&trigger[1]);
}

for(i=0;i<2*N_MEDIA+1;i++){ //N_MEDIA é o # de pontos para fazer a média
  if(i==N_MEDIA){
    fscanf(ExprData,"%lf",&tempo);
    fscanf(ExprData,"%lf",&x[BIOL][EXTRACEL]);
    fscanf(ExprData,"%lf",&x[MODEL][V]);
    fscanf(ExprData,"%lf",&x[BIOL][V]);
    x[MODEL][EXTRACEL] = x[MODEL][INTRACEL]; //igualei os sinais intra e extra-
    celulares para facilitar
    //a utilização na rotina de deteccao
de spikes...
  }
  else{
    fscanf(ExprData,"%lf",&Htempo[i]);
    fscanf(ExprData,"%lf",&HxBE[i]);
    fscanf(ExprData,"%lf",&HxMV[i]); //História das variaveis lidas, passado e
futuro...
    fscanf(ExprData,"%lf",&HxBV[i]);
    //xME[i] = xMI[i];
  }
}
do{
  DeslocaVetor(Htempo);
  DeslocaVetor(HxBE);
  DeslocaVetor(HxMV); //desloca elementos dos vetores que contem os dados para
comportar o
  DeslocaVetor(HxBV); //novo elemento que será lido do arquivo
  fscanf(ExprData,"%lf",&Htempo[2*N_MEDIA]);
  fscanf(ExprData,"%lf",&HxBE[2*N_MEDIA]); //le arquivo e coloca no último
elemento do vetor
  fscanf(ExprData,"%lf",&HxMV[2*N_MEDIA]);
  if((fscanf(ExprData,"%lf",&HxBV[2*N_MEDIA])==EOF)) sai=true; //verifica se
terminou arquivo

  tempo = Htempo[N_MEDIA];
  x[BIOL][EXTRACEL] = HxBE[N_MEDIA];
  x[MODEL][V] = HxMV[N_MEDIA]; //as variáveis consideradas sao o elemento
médio do vetor histórico!
  x[BIOL][V] = HxBV[N_MEDIA];
  x[MODEL][EXTRACEL] = x[MODEL][INTRACEL]; //gambi para utilizar rotinas prontas
intra=extra

  //void stat(double /*media*/,double/*std*/, double/*vet*/, int/*num*/);
  stat(&xprev[MODEL][V],&lixo,HxMV,N_MEDIA); //xprev é a média dos N_media pontos
anteriores
  stat(&xprev[BIOL][V],&lixo,HxBV,N_MEDIA);

  stat(&xpost[MODEL][V],&lixo,HxMV[N_MEDIA+1],N_MEDIA); //xpost é a média dos
N_media pontos posteriores
  stat(&xpost[BIOL][V],&lixo,HxBV[N_MEDIA+1],N_MEDIA);

  //fprintf(fp,"%lf %lf\n",tempo,xprev[MODEL][V]);
  //printf("tempo = %f\n",tempo);

  //neurons dynamical variables updated

  for(i=0;i<NumNeus;i++){//incluir a análise para o biol apos testes
    if( ((xprev[i][V]-trigger[i])*(xpost[i][V]-trigger[i]))<=0 && xpost[i]
[V]<=trigger[i] && triggerflag[i]){
      printf("tempo = %lf trigger %d\n",tempo,i);
      if(i==0) //neu de referência é sempre o zero
        for(j=1;j<NumNeus;j++){
          fase[j][contmin[0]]=(prevertime[j]-prevertime[0])/(tempo-
prevertime[0]);
        }
    }
  }
}

```

```

        triggerflag[i]=0;
        contmin[i]++;
        freq[i][contmin[i]]=(double)1.0/(tempo-prevtime[i]);
        prevtime[i]=tempo;
        //contdisp++;
        disp[contdisp++]= (double) i;
    }
    if(tempo>FrameSpk[i]) FlagSpk[i] = true; //passado mais de 8ms
        //desde o último spke
    if(x[i][EXTRACEL]>=SpkTrigger[i] && FlagSpk[i]){ //significa que
        //encontrou um spike
        triggerflag[i]=1;//libera a deteccao de hiperpolarizacoes
        FlagSpk[i] = false; //usado para esperar um pouco de tempo
        //até detectar novamente um spike
        FrameSpk[i] = tempo + 0.008; //aguarda 8 ms para detectar
        //spk novamente
        //if (findpeak(x[i][Vax]-xprev[i][Vax],&derivant[i])==1){
            isi[i][indexpeak[i]]=tempo-prevpeak[i];
            prevpeak[i]=tempo;
            indexpeak[i]++;
            printf("Spike Neu%d at %lf\n",i,tempo);
        //}
    }
}
}while(!sai);//fecha o for de contagem do tempo
//fclose(fp);

//*****
//compute de average main frequency and std deviation

for(pos=0;pos<NumNeus;pos++)
    stat(&avefreq[pos],&stdfreq[pos],&freq[pos][2],contmin[pos]-2);

//-----
--
//This computes de average phase and std deviation
for(pos=1;pos<NumNeus;pos++)
    stat(&avefase[pos],&stdfase[pos],&fase[pos][1],contmin[pos]-1);

//This computes de average ISI and std deviation
for(pos=0;pos<NumNeus;pos++)
    stat(&aveISI[pos],&stdISI[pos],&isi[pos][2],indexpeak[pos]-2);

//-----
//Check periodicity on hiperpolarization

prd_hip=period_check(&freq[0][2],contmin[0]-2,2,5e-5);
printf("Hiperpolarization period = %d\n",prd_hip);

//*****
//Check periodicity on bursts

prddisp=period_check(disp,contdisp-1,contmin[0]-3,5.e-5);
printf("Periodic on bursts = %d\n",prddisp);

//-----
//***** Let's check periodicity on spikes*****

rtrn=period_check(&isi[0][10],indexpeak[0]-11,20,0.2);

//-----
//Calcula o número médio de spikes por burst

for(i=0;i<NumNeus;i++)
    Spb[i] = ContaSpikesPorBurst(&isi[i][2],indexpeak[i]-2,0.2);
        //Retorna o número de Spikes
        //de spikes por burst
//-----
//Computes the average synaptic current
//sum_itot_count=int((float)t_integr*(float)scale/(float)dt/(float)1000.0);
/* for(i=0;i<NumNeus;i++){
    ave_curr[i]=sum_itot[i]/(double)sum_itot_count[i];
    printf("Average synaptic current = %e\n",ave_curr[i]);
}

```

```

//-----
*/

printf("Program finished successfully in %ld s\n\n",time(NULL)-t);
return(rtrn);
}
//-----

int findpeak(double deriv,double *ant){
int peakflag=0;
if(ant[0]>0 && deriv<0){
peakflag=1;
//printf("pico, prod=%e\n",ant[0]*deriv);
}
ant[0]=deriv;
return(peakflag);
}
//-----

void DeslocaVetor(double *Vetor){
for(int j=0;j<2*N_MEDIA+1;j++) Vetor[j]=Vetor[j+1];
}
/*****

int period_check(double *vet,int peaknum,int test,double eps){
#define eps 5.0000e-4
int i,j;

if(peaknum<2*test+3){
printf("insufficient number of peaks to detect periodicity\n");
return(-1);
}
for(i=1;i<peaknum+2;i++){
//printf("%d=%f\n",i,vet[i]);
if(fabs(vet[i]-vet[0])<eps) break;
}
for(j=0;j<test;j++){
if(fabs(vet[j]-vet[j+i])>eps) break;
}
if(j==test){
printf("period %d found\n",i);
return(i);
}
else {
printf("no periodic behavior detected\n");
return(-10);
}
}
//-----

float ContaSpikesPorBurst(double*VetIsi,int NumIsi,double LargHiperpol){
#define LargHiperpol 0.2
int i,j,cont=0;
int Vspb[10000];
int Nspb=0; //numero de spikes por burst
float aux=0.0;
if(NumIsi>10000) return(-1);
if(NumIsi<2) return(-11);
for(i=2;i<NumIsi;i++){
if(VetIsi[i]>LargHiperpol){
Vspb[cont] = Nspb;
Nspb = 0;
cont++;
}
Nspb++;
}
for(i=1;i<cont;i++) aux+=Vspb[i]; //soma para calcular a média
//eliminada a contagem Vnsps[0] da soma

if(cont>1) {
return(aux/(float)(cont-1));
}
else{
return(-10); //menos de duas hiperpolarizacoes encontradas
}
}

```

```

/*****
/*****
double *dvector(long nl, long nh)
    /* allocate a double vector with subscript range v[nl..nh] */
{
    double *v;

    v=(double *)malloc((size_t) ((nh-nl+1+NR_END)*sizeof(double)));
    if (!v) exit(0);//nrerror("allocation failure in dvector()");
    return v-nl+NR_END;

}
/*****
double sigmoid(double Vs, double V_desl, double Incl){
    return(1.0/(1.0+exp((Vs+V_desl)/Incl)));
}
//-----
double **dmatrix(long nrl, long nrh, long ncl, long nch)
    /* allocate a double matrix with subscript range m[nrl..nrh][ncl..nch] */
{
    long i, nrow=nrh-nrl+1,ncol=nch-ncl+1;
    double **m;

    /* allocate pointers to rows */
    m=(double **) malloc((size_t)((nrow+NR_END)*sizeof(double*)));
    if (!m) exit(1);//nrerror("allocation failure 1 in matrix()");

    m += NR_END;
    m -= nrl;

    /* allocate rows and set pointers to them */
    m[nrl]=(double *) malloc((size_t)((nrow*ncol+NR_END)*sizeof(double)));
    if (!m[nrl]) printf("nrerror(\\"allocation failure 2 in matrix()\\\"\n");
    m[nrl] += NR_END;
    m[nrl] -= ncl;

    for(i=nrl+1;i<=nrh;i++) m[i]=m[i-1]+ncol;

    /* return pointer to array of pointers to rows */
    return m;
}
//-----
void stat(double *ave,double *std, double* vet, int num){
    int k;
    double sum=0,media;
    if(num<=2) {/needs at least three values of periods to calculate frequency
        *ave = -1.0;
        *std = 0.0;
    }
    else{
        for(k=0;k<num;k++) sum+=vet[k];//sum to compute average
        media = sum/num;
        sum=0;
        for(k=0;k<num;k++) sum+=(media-vet[k])*(media-vet[k]);
        *std = sqrt(sum/(num-1.0));
        *ave = media;
    }
}

//Fim do programa Analise.c
//-----

```

## C. Listagem do programa IntegraRede.c

```

/*****
IntegraRede.c
Programa de integração de pequenas redes neurais biológicas
com um número arbitrário de neurônios e conexões sinápticas
entre eles. Os modelos de neurônios podem ser modificados e consistem
em equações diferenciais acopladas. Método de solução é o Runge-Kuta
de sexta ordem com passo adaptado.
Marcelo Bussotti Reyes - Instituto de Física da Universidade de São Paulo
Rotina de integração: Runge-Kutta de 6a ordem com passo ajustável adaptado de:
Pablo Varona - Institute for Non-Linear Science - UCSD, CA, USA*/
/*****/
/*****/
#include <math.h>
#include <stdio.h>
#include <stdlib.h>
#include <time.h>
#include <ctype.h>
#include <string.h>
#include <math.h>

#define NumNeus 2 //represents the number of neurons in the network
//#define DIMITOT DIM+2
#define M 14 //number of equations for each neuron
#define DIM M*NumNeus //DIM is the number of 1st order autonomous differential
equations
#define scale 1.0 //proportionality factor between integr. step and real time
//um passo em segundos é igual a dt/scale
// In Mischa model dt(real)=dt(integration)/1000

#define save 1
#define RPT 1 //go through the parameter space
#define CyclicIC 1
#define BIF_DIAGRAM 0

#define INCREASE_RESOLUTION 0 //mode for changing the parameters
//set to zero to make a zigzag or bifurcation diagram

#define DELTA_PAR1 0.1 //only works when INCREASE_RESOLUTION = 0
#define DELTA_PAR2 0.0e-6 //only works when INCREASE_RESOLUTION = 0

#define INTEGRATION_TIME 5.0e3
#define TRANSIENT_TIME 10.0e3

#define ABS( X ) (((X)>0.0)?(X):-(X))
#define MMAX(X,Y) (((X)>(Y))? (X):(Y))
#define MMIN(X,Y) (((X)<(Y))? (X):(Y))
#define ABSERR 1e-15
#define FRAME_INCT 1
#define NR_END 1

//Incluir aqui o índice de variáveis dinâmicas

#define gsyn 0
#define taus 1
#define Sinf 2
#define Ssyn 3

void funcao(double tiempo,double *,double *);
double corrente_sinaptica(double *, double , double , double);
int inley(double ,double ,double *,double ,double *,double *, double *, double *,
double **,double );
double sigmoid(double Vs, double V_desl,double Incl);
int findpeak(double,double *);
int period_check(double *,int,int,double);
int principal(double,double,char *);
float ContaSpikesPorBurst(double*,int,double);
void stat(double /**media*/,double/**std*/, double/**vet*/, int/**num*/);
double *dvector(long nl, long nh);
double **dmatrix(long nrl, long nrh, long ncl, long nch);
double MtxSyn[NumNeus][NumNeus][4];
; //Matrix with synaptic variables
//MtxS[pre][pos][0] = g[pre][pos]

```

```

//MtxS[pre][pos][1] = Sinf[pre][pos]
//MtxS[pre][pos][2] = Ssyn[pre][pos]
//MtxS[pre][pos][3] = taus[pre][pos]

double x[NumNeus][M];
double xprev[NumNeus][M];
double Ic[NumNeus][NumNeus];
/*****/

double Vthres=-45.0;
double Vslope=40.0; //amplitude do spike
double Vrev=-80.0; //± 30% abaixo do mínimo da hiperpolariz
//alterei o valor de 1.5 para 1.58 pois estavam acontecendo
//correntes positivas
/*****/

double Itot[NumNeus]; //=(0.0; //Itot is the total synaptic current entering the neuron
[index]
double I=0.0;
double Ip;
int contmin[NumNeus];
double avefreq[NumNeus], stdfreq[NumNeus];
double ave_curr[NumNeus];
double gp=0.0;
int prddisp; //this saves the period on burst sequence
int Neu;
double Spb[NumNeus];
double Iaux=0.0;
double aveISI[NumNeus], stdISI[NumNeus];
double avefase[NumNeus], stdfase[NumNeus];
void Roda(void);

FILE *ps,*Diabif;
int prd;
char name[20],number[20],data[10];

//Parameters for parameter generator
static double MinPar1=1.9, //gKCa
              MaxPar1=2.2, //Adjust here
              MinPar2=5.0e-4, //gsin
              MaxPar2=0.0e-4;
//-----

double ld1=(MaxPar1-MinPar1)/4.,lp1=(MaxPar1-MinPar1)/2.,
ld2=0,lp2=(MaxPar2-MinPar2)/2.,cd1=0,cp1=(MaxPar1-MinPar1)/4.,cd2=(MaxPar2-
MinPar2)/4.,cp2=(MaxPar2-MinPar2)/2.;
double Par1,Par2;

int main(void){
    int i;
    if((ps=fopen("paraspc.dat","w"))==NULL){
        printf("Couldn't read paraspc.dat\n");
        exit(0);
    }

    if((Diabif=fopen("diabif.dat","w"))==NULL){
        printf("Couldn't read diabif.dat\n");
        exit(0);
    }

    fprintf(ps,"g_KCa gp prd ");
    for(i=0;i<NumNeus;i++)
        fprintf(ps,"cont%d ave%d std%d Spb%d avecurr%d AveISI%d stdISI%d
avefase%d stdfase%d ",i,i,i,i,i,i,i,i,i);
    fprintf(ps,"prddisp \n");
    //-----
    //This goes through the parameter space increasing uniformly its resolution

    if(RPT){
        for(Par1=MinPar1;Par1<=MaxPar1;Par1+=DELTA_PAR1)
            for(Par2=MinPar2;Par2<=MaxPar2;Par2+=DELTA_PAR2)
                Roda();
    }
    //end of parame
    else{
        Par1 = 1.50;

```

```

        Par2 = 0.0e-6;
        Roda();
    }
    //-----
    fclose(ps);
    fclose(Diabif);
    printf("\n");
    printf("%d\n",prd);
}
//-----
void Roda(void){
    g_KCa = Par1;
    gp    = Par2;
    printf("%e %e\n",gp,g_KCa);

    if(RPT) sprintf(name,"lixo.dat");
    if(save) sprintf(name,"KCa%.2lf%.2lf%.2lf.dat",Par1,Par2*1.0e6);

    prd=principal (INTEGRATION_TIME,TRANSIENT_TIME,name);
    fprintf(ps,"%e %e %d ",Par1,Par2,prd);
    for(int i=0;i<NumNeus;i++){
        fprintf(ps,"%d %e %.2e %lf %e %e %.2e %lf %.2e ",
            contmin[i],1000.0*avefreq[i],1000.0*stdfreq[i],
            Spb[i],ave_curr[i],aveISI[i]/1000.0,stdISI[i]/1000.0,
            avefase[i],stdfase[i]);
    }
    fprintf(ps,"%d\n",prddisp);

    fflush(ps);
}

/*****
int principal(double t_integr,double t_tran,char filename[25]){
    FILE *fp,*fp1,*fp2,*ret;
    FILE *freqfile;
    double prevtime[NumNeus],tempo=0.0;
    double trigger=-43.0,freq[NumNeus][1000],sum,fase [NumNeus][100];
    double derivant[NumNeus],deriv[NumNeus],prevpeak[NumNeus];
    double isi[NumNeus][10000];
    double sum_itot[NumNeus];//=0.0;
    float meanspike=10.0;
    double disp[500]; //used double to take advantage of the function period_check
    int contdisp=-1; //used to map the burst sequence (hiperpolir. seq)
    int rtrn;
    int prd_hip;
    long int sum_itot_count[NumNeus];//=0;
    unsigned long int tc;
    int i,j,pre,pos,triggerflag[NumNeus];
    int indexpeak[NumNeus];
    time_t t; //used to estimate the time for running the program
    double aux[NumNeus];
    double time_int,t0transient1= 5.;
    double inct=1e-6; //1e-6 //para este programa funcionar no windows tive que
colocar o inct para 1e-2
    double inct_ant=0.;
    double *variables_hat,**kk, *apoyo,*retorno, *variables;
    double *variables_loc;
    double time_step = 0.0;

    t=time(NULL);

    variables=dvector(0,DIM);

    apoyo=dvector(0,DIM);
    retorno=dvector(0,DIM);
    variables_hat=dvector(0,DIM);
    variables_loc=dvector(0,DIM);
    kk=dmatrix(0,6,0,DIM);

    for(i=0;i<NumNeus;i++){ //Iniciates the synaptic variables
        derivant[i]=0;
        deriv[i]=1;
        triggerflag[i]=0;//mudei aqui para zero, antes era 1

```

```

    prevtime[i]=0;
    prevpeak[i]=0.0;
    contmin[i]=0;//-1;
    sum_itot[i]=0.0;
    indexpeak[i]=0;
    for(j=0;j<NumNeus;j++){
        MtxSyn[i][i][gsyn]=0.0;
        MtxSyn[i][i][taus]=0.0; //zerando a matriz de variáveis sinápticas
        MtxSyn[i][i][Sinf]=0.0;
        MtxSyn[i][i][Ssyn]=0.0;
    }
}

//Set the synaptic connections here
//usage:
//MtxSyn[PreSinapticNeuron][PostSinapticNeuron][sinapticParameter]

//These first are for two reciprocally inhibitory connections
//Set: NumNeus = 2
    MtxSyn[0][1][gsyn]=gp;
    MtxSyn[0][1][taus]=10.0;

    MtxSyn[1][0][gsyn]=gp;
    MtxSyn[1][0][taus]=10.0;
//-----
//These are for the simplified cpg
//set NumNeus = 3

    //MtxSyn[0][1][gsyn]=gp;
    //MtxSyn[0][1][taus]=10.0;

    //MtxSyn[1][0][gsyn]=gp;
    //MtxSyn[1][0][taus]=10.0;

    //MtxSyn[1][2][gsyn]=gp;
    //MtxSyn[1][2][taus]=0.010;

    //MtxSyn[2][0][gsyn]=2.0*gp;
    //MtxSyn[2][0][taus]=0.010;

    //MtxSyn[0][2][gsyn]=2.0*gp;
    //MtxSyn[0][2][taus]=0.010;

    //MtxSyn[2][1][gsyn]=gp/5.0;
    //MtxSyn[2][1][taus]=0.010;

//-----

//*****
//open files to write dynamical variables
if((fp=fopen(filename,"w"))==NULL){ //file for membrane potentials
    printf("Couldn't create file\nprogram aborted\n");
    exit(1);
}

if((fpl=fopen("initcond.dat","r"))!=NULL){ //try to read
    //initial conditions from initcond.dat
    for(i=0;i<NumNeus;i++){
        for(j=0;j<M;j++){
            fscanf(fpl,"%lf",&x[i][j]);
        }
    }
    fclose(fpl);
    printf("Ic read from initcond.dat\n");
}
else{
    printf("Couldn't read IC\nload default\n",fpl);
    //exit(0);
    for(i=0;i<NumNeus;i++){
        x[i][0]=-52.6896657132625989600+(float)i*0.5; //deltax gives the
        x[i][1]=2.1790550738448457580;//difference in initial conditions
        x[i][2]=0.0056935725624609398;//condicoes iniciais
        x[i][4]=0.6836680498672979000;
        x[i][5]=0.0260241567723770370;
    }
}

```



```

        x[i][6]=0.9842652361470087818;
        x[i][7]=0.0708515410780189148; //initial conditions for the HH2C model
        x[i][8]=0.3398902413785575005; //for HR model almost any initial
        x[i][9]=0.0474145467346798327; //condition converges
        x[i][10]=0.3654065423783397493;
        x[i][11]=0.0526824330148126588;
        x[i][12]=0.0302975756966933421;
        x[i][13]=0.0269675034394964604;
        x[i][14]=-52.7998664152913690400;
    }
}

variables = &x[0][0];
/*****Transient*****/
for (tempo = 0.0;tempo<t_tran;)
{
    for(j=0;j<DIM;++j) variables_loc[j]=variables[j];

    for(pos=0;pos<NumNeus;pos++){
        Itot[pos]=0.0;
        for(pre=0;pre<NumNeus;pre++){
            if(pre!=pos) Itot[pos]+=Ic[pre][pos]; //soma correntes sinapticas de
            todos os neus pre-sinapticos
        }
    }

    RK6Adapt (VarDin,tempo,&dtSugerido,&dtDado,&funcao);
    tempo +=dtDado/scale;
    /*****
    for(pre=0;pre<NumNeus;pre++){
        for(pos=0;pos<NumNeus;pos++){
            if(pre!=pos) //remove if cnctns from one neu to itself allowed
            if (MtxSyn[pre][pos][gsyn]!=0.0)
                Ic[pre][pos]=corrente_sinaptica (&MtxSyn[pre][pos]
[0],x[pre][V],x[pos][V],inct);
        }
    }
    }//for do tempo
    printf("Transient finished\n");

/***** After transient *****/

    for(tc=0;tempo < (t_tran+t_integr);tc++)
    {
        for(i=0;i<NumNeus;i++)for(j=0;j<M;j++) xprev[i][j]=x[i][j]; //saves the
        membrane potentials for future usage
        for(j=0;j<DIM;++j) variables_loc[j]=variables[j];

        for(pos=0;pos<NumNeus;pos++){
            Itot[pos]=0.0;
            for(pre=0;pre<NumNeus;pre++){
                if(pre!=pos) Itot[pos]+=Ic[pre][pos]; //soma correntes
                //sinapticas de todos os neus pre-sinapticos
            }
        }

        RK6Adapt (VarDin,tempo,&dtSugerido,&dtDado,&funcao);
        tempo +=dtDado/scale;
        /*****
        for(pre=0;pre<NumNeus;pre++){
            for(pos=0;pos<NumNeus;pos++){
                if(pre!=pos) //remove if cnctns from one neu to itself allowed
                if (MtxSyn[pre][pos][gsyn]!=0.0)
                    Ic[pre][pos]=corrente_sinaptica (
                    &MtxSyn[pre][pos][0],
                    x[pre][0],
                    x[pos][0],inct);
                Ic[pre][pos]=corrente_sinaptica (
                &MtxSyn[pre][pos][0],
                x[pre][V],
                x[pos][V],inct);
            }
        }
        }//neurons dynamical variables updated
        for(i=0;i<NumNeus;i++){

```

```

if( ((xprev[i][V]-trigger)*(x[i][V]-trigger))<=0 &&
    x[i][V]<=trigger && triggerflag[i]){
    if(i==0) //neu de referência é sempre o zero
        for(j=1;j<NumNeus;j++){
            fase[j][contmin[0]]=
                (prevtime[j]-prevtime[0])/(tempo-prevtime[0]);
        }

    triggerflag[i]=0;
    contmin[i]++;
    freq[i][contmin[i]]=(double)1.0/(tempo-prevtime[i]);
    prevtime[i]=tempo;
    disp[contdisp++]= (double)i;
}
if(x[i][Vax]>=meanspike){ // && x[0][0]>1.5){
    triggerflag[i]=1;
    if(findpeak(x[i][Vax]-xprev[i][Vax],&derivant[i])==1){
        isi[i][indexpeak[i]]=tempo-prevpeak[i];
        prevpeak[i]=tempo;
        indexpeak[i]++;
        if(BIF_DIAGRAM)
            if(i==0 && indexpeak[i]>2)
                fprintf(Diabif,"%lf %lf\n",
                    g_KCa,isi[i][indexpeak[i]]);
    }
}
}
if (time_step<tempo) { // Here we stored the simulation each FRAME_INCT times
    time_step+=FRAME_INCT;
    for(pos=0;pos<NumNeus;pos++){
        aux[pos]=0.0;
        for(pre=0;pre<NumNeus;pre++){ //computes the total synaptic
currentfor the first neuron
            aux[pos]+=Ic[pre][pos]; //aux[pos] = Itot for neuron pos
        }
        sum_itot[pos]+=aux[pos];
        sum_itot_count[pos]++;//printf("%f %f \n",sum_itot,Ic[1][0]);
    }
    if(save){
        fprintf(fp,"%5e ",tempo);
        for(j=0;j<NumNeus;j++){
            //for(i=0;i<1;i++) fprintf(fp,"%f ",x[j][i]);
            //fprintf(fp,"%f ",aux[j]);
            fprintf(fp,"%lf %lf ",x[j][V],x[j][Vax]);
        }
        //for(i=0;i<4;i++)
        fprintf(fp,"%lf %lf %lf %lf ",MtxSyn[0][1][Sinf],
            MtxSyn[0][1][Ssyn],
            MtxSyn[1][0][Sinf],
            MtxSyn[1][0][Ssyn]);
        fprintf(fp,"\n");
    }
}
} //fecha o for de contagem do tempo
//fclose(fp);

//*****
//compute de average main frequency and std deviation
for(pos=0;pos<NumNeus;pos++)
    stat(&avefreq[pos],&stdfreq[pos],&freq[pos][2],contmin[pos]-2);

//-----
//This computes de average phase and std deviation
for(pos=1;pos<NumNeus;pos++)
    stat(&avefase[pos],&stdfase[pos],&fase[pos][1],contmin[pos]-1);

//This computes de average ISI and std deviation
for(pos=0;pos<NumNeus;pos++)
    stat(&aveISI[pos],&stdISI[pos],&isi[pos][2],indexpeak[pos]-2);

//-----
//Check periodicity on hiperpolarization

```

```

    prd_hip=period_check(&freq[0][2],contmin[0]-2,2,5e-5);
    printf("Hiperpolarization period = %d\n",prd_hip);

/*****
//Check periodicity on bursts

    prddisp=period_check(disp,contdisp-1,contmin[0]-3,5.e-5);
    printf("Periodic on bursts = %d\n",prddisp);

*****/

//save initial conditions to file, if desired
if(CyclicIC){
    if( (fp1=fopen("initcond.dat","w"))==NULL){
        printf("Couldn't open file\n to write IC\nquiting",fp1);
        exit(1);
    }
    else{
        for(i=0;i<NumNeus;i++){
            for(j=0;j<M;j++) fprintf(fp1,"%%.19lf ",x[i][j]);
            fprintf(fp1,"\n");
        }
        fclose(fp1);
    }
}

//-----
/***** check periodicity on spikes*****/

    rtrn=period_check(&isi[0][10],indexpeak[0]-11,20,0.2);

//-----
//Calcula o número médio de spikes por burst

    for(i=0;i<NumNeus;i++){
        Spb[i] = ContaSpikesPorBurst(&isi[i][2],indexpeak[i]-2,150.0);
        //Retorna o número de Spikes
        //spikes por burst
//-----
//Computes the average synaptic current
//sum_itot_count=int((float)t_integr*(float)scale/(float)dt/(float)1000.0);
    for(i=0;i<NumNeus;i++){
        ave_curr[i]=sum_itot[i]/(double)sum_itot_count[i];
        printf("Average synaptic current = %e\n",ave_curr[i]);
    }
//-----

    printf("Program finished successfully in %ld s\n\n",time(NULL)-t);
    //getch();
    fclose(fp);
    //fclose(ret);
    return(rtrn);
}

/*=====
=====*/
/* funcion to integrate */

//The function to be integrated must be included here
/*=====*/

double corrente_sinaptica(double *VarSynPrePos,
                        double Vpre,
                        double Vpos,
                        double dt)
//Used to update the synaptic currents
{
    //remembering: Varpre[0..DIM-1]=neuron variables
    // Varpre[DIM]=Sinf e Varpre[DIM+1]=Ss
    double Isynaptic,S_inf_ant,S_ant,S_inf,Ss;
    double gprepos,tausprepos;

    gprepos = VarSynPrePos[gsyn];
    tausprepos = VarSynPrePos[taus];

```

```

    S_inf_ant = VarSynPrePos[Sinf];
    S_ant = VarSynPrePos[Ssyn];
    //Vpre=VarDinPre[0];
    //Sinf_ant=S_inf;
    //S_ant=Ss;
    if (Vpre>Vthres)
        S_inf=tanh((Vpre-Vthres)/Vslope);
    else S_inf=0.0;
    VarSynPrePos[Sinf]=S_inf;

    if (S_inf_ant==1.0)
        Ss=1.0;
    else Ss=S_inf_ant+(S_ant-S_inf_ant)*exp((-dt/scale)/((1-
S_inf_ant)*tausprepos));
    VarSynPrePos[Ssyn]=Ss;
    Isynaptic=gprepos*Ss*(Vrev-Vpos);
    //} verificar
    return(Isynaptic);
}
//-----

int findpeak(double deriv,double *ant){
    int peakflag=0;
    if(ant[0]>0 && deriv<0){
        peakflag=1;
        //printf("pico, prod=%e\n",ant[0]*deriv);
    }
    ant[0]=deriv;
    return(peakflag);
}
//*****

int period_check(double *vet,int peaknum,int test,double eps){
    //define eps 5.0000e-4
    int i,j;

    if(peaknum<2*test+3){
        printf("insufficient number of peaks to detect periodicity\n");
        return(-1);
    }
    for(i=1;i<peaknum+2;i++){
        //printf("%d=%f\n",i,vet[i]);
        if(fabs(vet[i]-vet[0])<eps) break;
    }
    for(j=0;j<test;j++){
        if(fabs(vet[j]-vet[j+i])>eps) break;
    }
    if(j==test){
        printf("period %d found\n",i);
        return(i);
    }
    else {
        printf("no periodic behavior detected\n");
        return(-10);
    }
}
//-----

float ContaSpikesPorBurst(double*VetIsi,int NumIsi,double LargHiperpol){
    //define LargHiperpol 0.2
    int i,j,cont=0;
    int Vspb[10000];
    int Nspb=0; //numero de spikes por burst
    float aux=0.0;
    if(NumIsi>10000) return(-1);
    if(NumIsi<2) return(-11);
    for(i=2;i<NumIsi;i++){
        if(VetIsi[i]>LargHiperpol){
            Vspb[cont] = Nspb;
            Nspb = 0;
            cont++;
        }
        Nspb++;
    }
    for(i=1;i<cont;i++) aux+=Vspb[i]; //soma para calcular a média
    //eliminada a contagem Vspb[0] da soma

```

```

    if(cont>1) {
        return(aux/(float)(cont-1));
    }
    else{
        return(-10); //menos de duas hiperpolarizacoes encontradas
    }
}
/*****
double sigmoid(double Vs, double V_desl, double Incl){
    return(1.0/(1.0+exp((Vs+V_desl)/Incl)));
}

//-----
void stat(double *ave,double *std, double* vet, int num){
    int k;
    double sum=0,media;
    if(num<=2) { //needs at least three values of periods to calculate frequency
        *ave = -1.0;
        *std = 0.0;
    }
    else{
        for(k=0;k<num;k++) sum+=vet[k]; //sum to compute average
        media = sum/num;
        sum=0;
        for(k=0;k<num;k++) sum+=(media-vet[k])*(media-vet[k]);
        *std = sqrt(sum/(num-1.0));
        *ave = media;
    }
}

//Fim do arquivo IntegraRede.c
//-----
/*****
Rotina de integração de equações diferenciais ordinárias
acopladas.
Marcelo Bussotti Reyes
Instituto de Física da Universidade de São Paulo
Programa adaptado do original gentilmente fornecido por:
Pablo Varona
Institute for Nonlinear Science
University of California - San Diego
*****/

#include "BiblComumRK6.h"
#include <math.h>
#include <stdio.h>
#include <stddef.h>
#include <stdlib.h>
#define ABS( X ) (((X)>0.0)?(X):- (X))
#define MMAX(X,Y) (((X)>(Y))?(X):(Y))
#define MMIN(X,Y) (((X)<(Y))?(X):(Y))
#define ABSERR 1e-15
/* frame time interval */
#define FRAME_INCT 1
#define NR_END 1

double *dvector(long, long);
void nrerror(char []);
//float **matrix(long,long,long,long);
void funcao(double ,double *,double *);

int intey(double ,double ,double *,double ,double *,void (*)(double,double*,double*));
double inct=1.0e-6; //1e-6 //para este programa funcionar no windows tive que colocar
o inct para 1e-2
double SS=0.;
double trecor=0.;

int RK6Adapt(double *variables,double time,double *dt,double *TakenDt,void (*funcao)
(double, double*,double*)) {

    printf("entrei RK6\n");
    long j;
    inct=*dt;

```

```

double variables_loc[DIM];
for(j=0;j<DIM;++j) variables_loc[j]=variables[j];
while(intey(time,inct,variables,TOLERANCE,&SS,funcion)) {
    printf("sai do intey\n");
    inct=MMAX(SS,0.25*inct);
    for(j=0;j<DIM;++j) variables[j]=variables_loc[j];
}
*TakenDt=inct;
inct=MMIN(SS,4.0*inct);
inct=MMIN(inct,FRAME_INCT);
*dt=inct;
free(variables_loc);
return(0);
}

/*=====*/
/*=====*/
/* New integration routine, more powerfull 1,4 */

int intey(double tiempo,double inc_integracion,double *variables,double tol,double
*SS,void (*funcion)(double,double*,double*))
{
    double apoyo[DIM],retorno[DIM],variables_hat[DIM];
    double k[6][DIM];

    double u=0.0,u_y=0.0;
    int j;

    funcion(tiempo,variables,retorno);
    for(j=0;j<DIM;++j) k[0][j]=inc_integracion*retorno[j];
    for(j=0;j<DIM;++j) apoyo[j]=variables[j]+k[0][j]*.2;

    funcion(tiempo+inc_integracion/5,apoyo,retorno);

    for(j=0;j<DIM;++j) k[1][j]=inc_integracion*retorno[j];
    for(j=0;j<DIM;++j) apoyo[j]=variables[j]+k[0][j]*.075+k[1][j]*0.225;

    funcion(tiempo+inc_integracion*0.3,apoyo,retorno);
    for(j=0;j<DIM;++j) k[2][j]=inc_integracion*retorno[j];
    for(j=0;j<DIM;++j) apoyo[j]=variables[j]+k[0][j]*.3-k[1][j]*0.9+k[2][j]*1.2;
    funcion(tiempo+inc_integracion*0.6,apoyo,retorno);
    for(j=0;j<DIM;++j) k[3][j]=inc_integracion*retorno[j];
    for(j=0;j<DIM;++j) apoyo[j]=variables[j]+k[0][j]*0.075+k[1][j]*0.675-k[2][j]*0.6+k[3][j]*0.75;

    funcion(tiempo+inc_integracion*0.9,apoyo,retorno);
    for(j=0;j<DIM;++j) k[4][j]=inc_integracion*retorno[j];
    for(j=0;j<DIM;++j) apoyo[j]=variables[j]+k[0][j]*0.660493827160493
        +k[1][j]*2.5
        -k[2][j]*5.185185185185185
        +k[3][j]*3.888888888888889
        -k[4][j]*0.864197530864197;

    funcion(tiempo+inc_integracion,apoyo,retorno);
    for(j=0;j<DIM;++j) k[5][j]=inc_integracion*retorno[j];

    for(j=0;j<DIM;++j) variables_hat[j]=variables[j]+k[0][j]*0.1049382716049382+
        k[2][j]*0.3703703703703703+
        k[3][j]*0.2777777777777777+

        k[4][j]*0.2469135802469135;

    for(j=0;j<DIM;++j) variables[j]+=k[0][j]*0.098765432098765+
        k[2][j]*0.396825396825396+
        k[3][j]*0.231481481481481+
        k[4][j]*0.308641975308641-
        k[5][j]*0.035714285714285;

    for(j=0;j<DIM;++j) {
        u+=ABS(variables[j]-variables_hat[j]);
        u_y+=ABS(variables[j]);
    }
}

```

```

u=u/(double)DIM;
u_y=u_y/(double)DIM;
u_y=u_y*tol+ABSERR;

if(u>1.0e-20) *SS=0.9*inc_integracion*pow(u_y/u,.14285714285714285714);
else *SS = 10.0*inc_integracion;

if (u<u_y) return(0);
else return(1);
}

/*=====*/
/*=====*/

float **matrix(long nrl, long nrh, long ncl, long nch)
/* allocate a float matrix with subscript range m[nrl..nrh][ncl..nch] */
{
long i, nrow=nrh-nrl+1, ncol=nch-ncl+1;
float **m;

/* allocate pointers to rows */
m=(float **) malloc((size_t)((nrow+NR_END)*sizeof(float*)));
if (!m) nrerror("allocation failure 1 in matrix()");
m += NR_END;
m -= nrl;

/* allocate rows and set pointers to them */
m[nrl]=(float *) malloc((size_t)((nrow*ncol+NR_END)*sizeof(float)));
if (!m[nrl]) nrerror("allocation failure 2 in matrix()");
m[nrl] += NR_END;
m[nrl] -= ncl;

for(i=nrl+1;i<=nrh;i++) m[i]=m[i-1]+ncol;

/* return pointer to array of pointers to rows */
return m;
}

/*=====*/
/*=====*/
void nrerror(char error_text[])
/* Numerical Recipes standard error handler */
{
fprintf(stderr,"Numerical Recipes run-time error...\n");
fprintf(stderr,"%s\n",error_text);
fprintf(stderr,"...now exiting to system...\n");
exit(1);
}

```