

**Universidade de São Paulo
Instituto de Física**

**Do Caos à Dinâmica Não-Linear
de Redes Neurais Biológicas:
a implantação de uma nova linha de
pesquisa no LFNL-IFUSP**

Reynaldo Daniel Pinto

Tese apresentada ao Instituto de
Física da USP para a obtenção
do título de Livre Docente

**São Paulo
2005**

Agradecimentos

Muito aconteceu nesses últimos 10 anos aqui relatados! Tenho tanto a agradecer, e a tantas pessoas, que a impressão que faltou alguém sempre me perseguirá...

À minha mãe Erica, meu exemplo de vida, que sempre me incentivou e que tantas vezes soube entender a ausência que eu mesmo não me perdôo.

Ao Sartorelli, grande chefe, amigo e pai científico, por seus sempre sábios conselhos e pela maneira como acolheu minha idéia de trabalhar com redes neurais no LFNL.

À minha noiva Bia, por se mostrar tão compreensiva nestes tempos de turbulência...

Ao Prof. Allen Selverston, meu segundo pai científico.

Aos meus queridos amigos Carla Guimarães e Maurício Moralles, tio Alfredo, Tamura, Ramon Martins, Kátia, Kenvy Ng, Ewolt Haar, Andrea Rodas, Renata Camargo e Márcia Yamasoe.

À minha “família” de San Diego: Mary Jones, Ramón y Claudia Huerta, Pablo y Maye Varona, Rafi Levi, Attila e Eva Szücs, Thomas Nowotny, Misha e Ala Rabinovich, Gian Mário, Angélica, Mauro Copelli, Manuela Rosa, Augusto, Zrinka Kovarick, Bitty e Helena Rehen.

Aos Profs. Henry Abarbanel, Iberê Caldas e Silvio Salinas por terem me acolhido no INLS, no projeto temático e no corredor da mecânica estatística, respectivamente.

Às exemplares secretárias do INLS: Beryl Nasworthy e Terry Peters que tornaram minha vida em San Diego muito mais fácil.

Aos colegas, Professores e funcionários do Depto. de Física Geral que de alguma maneira colaboraram comigo nestes anos.

Ao Marcelo Reyes que soube passar a orientando sem deixar de ser amigo.

Aos meus estudantes que tanto me ensinaram nestes anos: Greg Stiesberg, Michael Denker, Gabriela Campos, Fábio Vannucchi, Pedro Carelli, Ludmila Rodrigues, Desirée Della Monica, Rogério Mazur, Caroline Forlim, Camila de Almeida e Bóris Marin.

Aos amigos e colegas do LFNL: Juliano Ribeiro, Thiago Nogueira, Viviane Piassi, Tiago Pereira, Ronaldo Castilho, Daniel Bonifácio, Alberto e Adriana Tufaile e Dariel.

Ao Sasha Volkovskii, ao Lev Tsimring, à Marina Samoilova e outros colegas do INLS.

Aos Profs. Constantino Tsallis, Paulo Murilo C. Oliveira, Roland Köberle, Eve Marder, Astrid Prinz, Brian Mulloney, Yuri Arshavskii, Miguel Nicolelis e Idan Segev pelo incentivo em diferentes etapas.

Aos funcionários e colegas do IFUSP sem os quais nada disso teria sido possível.

Aos amigos e colegas dos quais a vida teve o capricho de me separar.

À todos aqueles que me honraram com sua amizade.

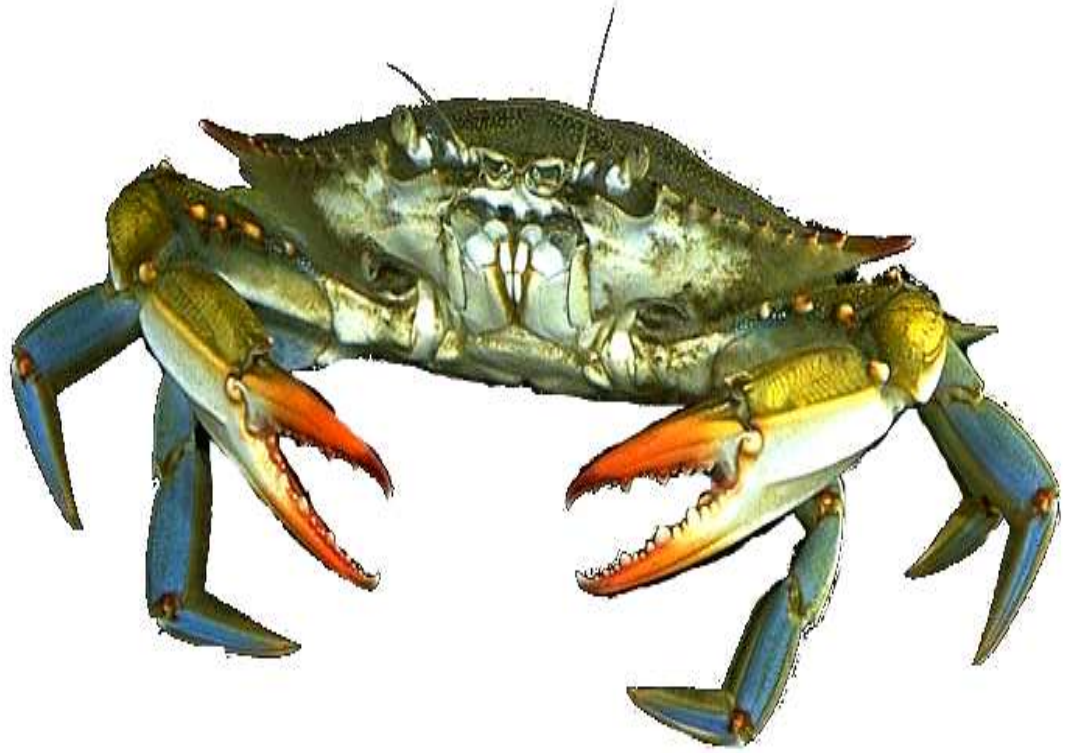
À diretoria do IFUSP.

Aos assessores *ad-oc* e *referees* que colaboraram com sugestões construtivas.

Aos crustáceos e moluscos que involuntariamente participam de nossas pesquisas.

Ao INLS-UCSD, ao MBL, ao CNPq, à Pró-Reitoria de Pesquisa da USP e à FAPESP pelo apoio financeiro.

Em memória de minha
querida *oma* Frieda.



Callinectes sapidus

“Eis o meu pobre elefante
pronto para sair
à procura de amigos
num mundo enfastiado
que já não crê nos bichos e
duvida das coisas.”

Carlos Drummond de Andrade,
O elefante em *A Rosa do Povo*, 1945.

*“Will it ever happen that mathematicians
will know enough about the physiology of the brain,
and neurophysiologists enough of mathematical discovery
for efficient cooperation to be possible?”*

Jacques Hadamard, 1865-1963

Resumo

Nesta tese são apresentados, de maneira resumida, os principais resultados de minhas atividades de pesquisa em dinâmica não-linear realizadas durante a instalação e consolidação do Laboratório de Fenômenos Não-Lineares (LFNL) no IFUSP, assim como as idéias que levaram a aplicar as técnicas da teoria de sistemas dinâmicos não-lineares a problemas em neurociência. Em seguida, são descritas as técnicas multidisciplinares desenvolvidas durante meu pós-doutoramento no Institute for Nonlinear Science (INLS) – Universidade da Califórnia em San Diego (UCSD) trabalhando com o sistema nervoso estomatogástrico de crustáceos. Finalmente, apresentamos a implementação da linha de pesquisa experimental em “Dinâmica Não-Linear de Redes Neurais Biológicas” no LFNL-IFUSP.

Abstract

We present the main results of the research in nonlinear dynamics during the construction and consolidation of the “Laboratory of Nonlinear Phenomena” (LFNL) at the Institute of Physics – University of São Paulo (IFUSP), as well as the ideas that led to the application of the nonlinear dynamical systems theory to multidisciplinary studies in neuroscience. The results obtained and the techniques developed during my post-doc working with the stomatogastric nervous systems of crustaceans at the Institute for Nonlinear Science (INLS) of the University of California, San Diego (UCSD) are also reported. Finally we describe the development of a new experimental research topic in the LFNL-IFUSP, the “Nonlinear Dynamics of Biological Neural Networks”.

Conteúdo

1. Introdução.....	9
2. No princípio era o Caos.....	16
2.1 - Dinâmica de formação de gotas d'água: a “torneira gotejante”.....	16
2.2 – A evolução do aparato experimental e os resultados.....	18
2.3 - A “transição” para a neurociência.....	28
3. O sistema nervoso estomatogástrico dos crustáceos.....	30
3.1 – Dissecção e preparação do gânglio estomatogástrico (STG).....	31
3.2 – Identificação das células do STG e bloqueio das sinapses.....	34
3.3 – Comportamento dinâmico intrínseco de neurônios do STG.....	37
4. Um laboratório de eletrofisiologia no IFUSP.....	41
4.1 - A idéia inicial.....	41
4.2 - Um aparato para o estudo de neurônios eletrônicos.....	41
4.3 - O biotério.....	42
4.4 - O aparato atual.....	44

5. Produção de sinapses artificiais em tecido vivo.....	50
5.1 - O protocolo “dynamic clamp”.....	50
5.2 - Modelos matemáticos da corrente sináptica e integração em tempo real.....	51
5.3 - Limitações e desafios atuais	56
6. “Neurônios eletrônicos”	57
6.1 - Modelo dinâmico do tipo Hindmarsh-Rose	57
6.2 - Implementação em circuito analógico e experimentos.....	59
7. Circuitos híbridos.....	68
8. Caos e centros geradores de padrões.....	72
9. Aparecimento de comportamento caótico em modelos estocásticos da atividade de neurônios isolados.....	80
10. Análise da atividade em bursts dos neurônios do STG e a Teoria da Informação.....	85
11. Conclusão.....	98
12. Referências.....	100

1. Introdução

Comportamentos complexos produzidos pela não linearidade de sistemas dinâmicos podem ser observados diariamente em muitos fenômenos corriqueiros. A complexidade se faz presente nas formas produzidas nas nuvens, nas oscilações da chama de uma vela e em efeitos catastróficos como os furacões que varrem imensas áreas da superfície do planeta. Há mais de um século, Poincaré (apud Abraham e Shaw, 1992) estudando um modelo de 3 corpos baseado no movimento planetário percebeu que trajetórias inicialmente próximas podiam divergir rapidamente. Este tipo de divergência foi estudado por Lyapunov que definiu as bases para o estudo da estabilidade de trajetórias. Entretanto, até ~1960 o desenvolvimento do estudo de sistemas dinâmicos não-lineares foi bastante lento.

Durante as últimas décadas, impulsionada pelo acesso aos computadores modernos, a evolução do estudo dos fenômenos não-lineares implicou num renascimento da Física Clássica, e no estabelecimento da recentemente construída teoria de Sistemas Dinâmicos e Caos (Gleick, 1990; Lewin, 1993). A abordagem topológica e a teoria das bifurcações em sistemas dinâmicos (Alligood *et al.*, 1997) tornaram-se rapidamente as fontes mais importantes de modelos para os processos dinâmicos da natureza.

A contração de volumes no espaço de fase em sistemas dissipativos levou à descoberta de que a dinâmica de muitos sistemas pode ser observada em uma pequena região que concentra as órbitas do sistema após um transiente. Quando esta região possui dimensão não inteira e menor que a dimensão do espaço de fase é chamada de atrator estranho, sendo sua presença um indicativo de comportamento complexo (Ruelle e Takens, 1971).

O termo Caos foi cunhado apenas em 1975 por *Li e Yorke* (Li e Yorke, 1975); a introdução do conceito de atrator estranho caótico e sua forte ligação com a dependência sensível às condições iniciais permitiram a elaboração de uma teoria matemática dos processos caóticos.

Essa nova teoria se mostrou extremamente adequada para abordar muitos problemas onde as antigas e bem estabelecidas técnicas clássicas de análise mostravam-se insatisfatórias. Muitos fenômenos naturais turbulentos e complexos, que eram evitados por serem intratáveis no formalismo clássico, encontraram explicações elegantes na Teoria do Caos, que se transformou em um campo de pesquisa em rápida expansão e multidisciplinar.

Um método simplificado do cálculo da dimensão fractal de um atrator estranho foi desenvolvido por *Grassberger e Procaccia* (Grassberger e Procaccia, 1983) e empregado indiscriminadamente para determinar a presença de comportamento caótico nas mais diversas áreas, da Física à Psicologia. Muitas críticas a essa euforia inicial foram feitas devido à descoberta de atratores estranhos não caóticos (Ding *et al.*, 1989; Brindley e Kapitaniak, 1991).

Rössler (Rössler, 1977) sugeriu que o gotejamento de uma torneira poderia ser um exemplo de sistema que apresenta comportamento caótico. A partir de 1984, com

o trabalho de *Shaw* (Shaw, 1984), diversos grupos reproduziram o experimento (Martien *et al.*, 1985; Núñez-Yépez *et al.*, 1989; Wu e Schelly, 1989; Cahalan *et al.*, 1990; Dreyer e Hickey, 1990), e observaram comportamentos complexos, duplicações de período, bifurcações de vários tipos, etc. Na tentativa de explicar os fenômenos observados nesta experiência, foram construídos modelos muito simples e limitados. *Martien et al.* (Martien *et al.*, 1985) conseguiram simular, em um computador analógico, alguns atratores experimentais usando um modelo em que as equações hidrodinâmicas são simplesmente substituídas pelas equações de um sistema massa-mola: à medida que o volume de água preso ao bico da torneira aumenta, sua frequência de vibração diminui, até que atinge um ponto crítico, arbitrariamente escolhido, onde uma porção de água desprende-se do bico, formando uma gota, que impõe as condições iniciais para a próxima gota. *De Oliveira e Penna* (de Oliveira e Penna, 1994) simularam alguns comportamentos experimentais usando o método de Monte Carlo em um modelo tipo Ising bidimensional onde são consideradas a tensão superficial e uma atração tipo Van der Waals, além da força gravitacional, para determinar o instante de formação das gotas.

A riqueza de comportamentos não lineares e o desafio representado pela ausência de modelos teóricos satisfatórios tornou esta experiência um modelo de sistema dinâmico experimental muito interessante que, apesar da sua aparente simplicidade, exigiu uma abordagem experimental sofisticada para a obtenção de dados de alta qualidade.

Existiam algumas evidências de que a torneira gotejante apresentava comportamento caótico, como algumas bifurcações que poderiam ser trechos de rotas para o caos (Dreyer e Hickey, 1990), a aparência e a baixa dimensionalidade dos atratores reconstruídos (Martien, 1985). Entretanto, a maioria dos trabalhos experimentais com a torneira gotejante apresentava uma análise de dados qualitativa, baseada na aparência dos atratores reconstruídos. Ainda não havia sido demonstrado se a torneira gotejante apresentava comportamento caótico ou se a complexidade dos atratores observados era apenas produto do ruído experimental. A falta de resultados quantitativos devia-se à dificuldade de obter dados com qualidade e em quantidades suficientes para que os métodos de caracterização (Abarbanel, 1993) produzissem resultados confiáveis.

O ruído presente nos sistemas experimentais, por menor que seja, é suficiente para fazer com que um sistema estruturalmente instável se transforme em outro que seja estável, ou fique transitando entre um e outro, não permitindo observar a dinâmica com detalhe suficiente para a caracterização. De acordo com a teoria matemática da estabilidade estrutural dos sistemas dinâmicos e bifurcações, só é possível observar sistemas dinâmicos experimentais estruturalmente estáveis, e é difícil encontrar sistemas dinâmicos estruturalmente estáveis com dimensão maior que 2 (Abraham e Shaw, 1992). Assim, pode-se ter uma idéia do desafio que representou a construção de um aparato experimental em que é possível observar fenômenos não lineares em dimensões maiores que 2.

Durante a primeira fase de nosso trabalho, além de utilizarmos métodos como caracterização topológica (Abraham e Shaw, 1992) e dinâmica simbólica (Zhao e Zheng, 1993), investimos muito tempo e esforço para obter um sistema experimental onde pudéssemos obter dados confiáveis e de alta reprodutibilidade. Sempre

procuramos aprimorar o aparato experimental, que foi evoluindo de acordo com as novas necessidades que iam aparecendo durante o trabalho, até chegar à última versão (que provavelmente ainda não será a definitiva). Paralelamente, os métodos de caracterização e análise também foram evoluindo, possibilitando o confronto dos resultados obtidos por vários métodos diferentes e a utilização de técnicas gráficas alternativas para analisar a topologia dos atratores.

Dessa maneira, não só conseguimos mostrar a presença de atratores caóticos, crises e bifurcações de vários tipos na experiência da torneira gotejante, como também descobrimos atratores que apresentam órbitas homoclínicas e heteroclínicas e encontramos evidências de tangências homoclínicas em diferentes vazões. Descobrimos também, que a dinâmica de formação de gotas numa torneira apresenta as mesmas anticorrelações de longo alcance observadas em dados experimentais de intervalos entre batidas do coração em indivíduos saudáveis.

De um modo geral, a evolução concomitante das técnicas experimentais e de análise de dados, além de nos permitir obter uma grande quantidade de resultados, abriu muitas possibilidades de trabalhos futuros na própria experiência da torneira gotejante e em outras áreas. As técnicas desenvolvidas aplicam-se à muitos outros sistemas dinâmicos experimentais onde foram encontrados comportamentos dinâmicos semelhantes aos da torneira gotejante como: os dados de intervalos entre batidas cardíacas (Peng *et al.*, 1993), a dinâmica “íntegra e dispara” das redes neurais biológicas (Schiff *et al.*, 1994a) e o comportamento social de colônias de formigas (Bonabeu *et al.*, 1998), entre outros.

Uma das principais ferramentas utilizadas durante o trabalho foi a reconstrução do espaço de fases dos atratores experimentais (Takens, 1981) que, entretanto, só teve uma justificativa rigorosa quando o doutoramento já se encontrava a meio caminho andado. O teorema de reconstrução de Takens permite reconstruir um atrator topologicamente equivalente ao atrator original usando um vetor construído com coordenadas obtidas de uma série temporal de uma única variável do sistema dinâmico medida a intervalos de tempo constantes. Muitos sistemas dinâmicos experimentais, entretanto, não permitem sequer a escolha do tempo de amostragem da variável acessível, como acontece quando se medem séries de intervalos de tempo entre eventos, como por exemplo gotas que caem de uma torneira, disparos de neurônios, batidas de um coração, entre outros. Inspirado em sistemas deste tipo, T. Sauer (Sauer, 1997) trabalhou em uma generalização do teorema de Takens, mostrando que o mesmo tipo de técnica pode ser aplicado a sistemas com dinâmica do tipo “íntegra e dispara”.

Uma das mais inusitadas descobertas do final do século passado foi a presença de comportamento caótico em neurônios biológicos (Rabinovich *et al.*, 1997). Como um dos maiores desafios da ciência atual é a compreensão dos processos biofísicos que nos permitem perceber, agir, aprender e lembrar, as possibilidades de aplicar novas maneiras de interpretar o comportamento de neurônios sob um formalismo matemático tornaram-se muito promissoras. Entender o funcionamento de um sistema nervoso, mesmo dos mais simples, constitui um gigantesco desafio e um enorme esforço neste sentido tem sido feito pela comunidade científica nos últimos anos.

O sistema nervoso dos animais evoluiu de modo a resolver problemas muito complexos, relacionados com o controle do comportamento em ambientes naturais multidimensionais, não-estacionários e imprevisíveis. O próprio sistema nervoso é um dos sistemas mais complexos existentes na natureza. Esta complexidade é o resultado não apenas da interação de um grande número de elementos não-lineares e da sofisticada arquitetura das conexões, mas também da flexibilidade e plasticidade desses elementos. Todas as informações sensoriais que o sistema nervoso processa e todos os comportamentos motores gerados pelos animais são codificados na forma de sinais elétricos produzidos e transmitidos pelos neurônios.

A atividade elétrica neural é produzida por uma grande população de diferentes canais iônicos que os neurônios possuem em sua membrana celular. Estes canais podem permitir ou não a passagem seletiva de íons, dependendo do potencial em que a célula se encontra, da presença de substâncias químicas ou de alguma ação mecânica externa. Os canais iônicos conferem não apenas a característica especial de excitabilidade da célula que permite produzir os impulsos chamados de potenciais de ação, mas também permitem propagar estes sinais para outros neurônios através de regiões das membranas conhecidas como sinapses.

A Teoria da Informação (Shannon, 1948; Borst & Theunissen, 1999) constitui atualmente o método mais rigoroso de quantificar a confiabilidade de um código neural e é uma especialização da teoria matemática da probabilidade aplicada ao estudo da transmissão de informação em sistemas de comunicação. O rigor da teoria vem de medir a precisão da transferência de informação, determinando exatamente a distribuição de probabilidades de resposta dado um particular sinal de entrada, ou estímulo. Em redes neurais, a Teoria da Informação pode ser usada para quantificar precisamente a confiabilidade das funções de estímulo-resposta e sua utilidade tem sido reconhecida desde o início de seu desenvolvimento (Borst & Theunissen, 1999).

Estudar o processamento da informação sensorial no sistema nervoso observando os padrões espaço-temporais dos sinais elétricos produzidos pelos neurônios é uma tarefa bastante árdua (Rieke *et al.*, 1997), pois é muito difícil saber exatamente o que está sendo codificado e qual o código utilizado. Além disso, os neurônios e as redes neurais biológicas dos mais diversos sistemas nervosos operam em várias escalas temporais. O potencial de ação é a mais dramática e aparente forma de alteração do estado elétrico de um neurônio e, por constituir um meio eficiente para a transmissão e o processamento de sinais elétricos, foi convencionalmente considerado uma unidade básica de informação na comunicação neural.

Entretanto, além dos potenciais de ação, uma grande quantidade de neurônios é capaz de produzir diversos tipos adicionais de flutuações elétricas em seu potencial de membrana. Oscilações lentas do potencial, uma consequência da ativação de canais da membrana seletivos a Ca^{+2} ou canais de K^{+} dependentes da concentração de Ca^{+2} (Harris-Warrick, 2002), normalmente resultam em uma aceleração da taxa de disparo dos potenciais de ação, seguida por períodos silenciosos. Quando estas acelerações podem ser claramente distinguidas do resto da atividade do neurônio, elas são chamadas de trens ou *bursts*. Existe um amplo espectro de padrões de atividade neural que vai desde potenciais de ação disparados continuamente até ritmos compostos por trens periódicos. A atividade em *bursts* é geralmente relacionada à produção de ritmos

para o controle motor, mas pouco se sabe sobre sua importância no processamento de informação interneuronal ou sensorial.

A importância funcional dos bursts é muito bem compreendida em sistemas motores onde os neurônios produzem descargas em alta frequência em *bursts* para controlar fibras musculares de maneira confiável. A produção de *bursts* para comandar músculos é regulada de maneira sofisticada para obter uma resposta coordenada e otimizada da unidade motora. Vários estudos mostraram que os músculos são capazes de detectar mudanças sutis no *burst* do neurônio motor pré-sináptico (Hooper & Weaver, 2000), o que não é nem um pouco intuitivo se considerarmos as propriedades de filtro passa-baixas da sinapse entre o neurônio motor e o músculo (junção neuromuscular). O número de potenciais de ação e a frequência de disparo dentro de um burst são parâmetros-chave para o controle muscular (Morris & Hooper, 1997), entretanto, a não-linearidade da transformação de potenciais de ação em atividade muscular aumenta bastante a complexidade do problema (Brezina *et al.*, 2000). Como neurônios motores que operam em modo *bursting* não apenas comandam músculos mas também interagem com outros neurônios do circuito, principalmente através de mecanismos de realimentação, os *bursts* são usados para transmitir informação (ou comando) tanto para os músculos como para os outros neurônios. Para esse tipo de abordagem, as redes neurais conhecidas como CPGs (centros geradores de padrões) são muito úteis.

Os CPGs mais simples, presentes tanto em invertebrados como em vertebrados, são pequenas redes neurais (algumas dezenas de células) que se desenvolveram para produzir padrões motores espaço-temporais rítmicos sem a necessidade de estímulos sensoriais. Estes padrões controlam a contração de músculos usados para executar atividades repetitivas, como por exemplo andar, correr, nadar, mastigar. Evidentemente, os padrões gerados são fortemente influenciados não apenas por estímulos sensoriais, mas também por substâncias neuromoduladoras, porém as características fundamentais dos padrões são determinadas pelas configurações das conexões sinápticas e pelas propriedades biofísicas dos neurônios individuais. Diferentemente do que acontece com áreas mais complexas do sistema nervoso, o significado de cada um dos padrões observados pode ser facilmente compreendido pois está diretamente relacionado com a atividade motora dos músculos controlados pelo CPG.

Mesmo nestas redes neurais mais simples, apesar de diversos detalhes fisiológicos dos neurônios serem conhecidos, não se pode dizer que se compreenda, de forma rigorosa, como os padrões motores são produzidos. Isto é, em um nível reducionista, as propriedades fisiológicas das células e das sinapses foram estabelecidas, mas descobriu-se que a operação total da rede neural é uma “propriedade emergente” do sistema, que é mais que a simples soma de partes (Selverston *et al.*, 2001).

Quais são os princípios fundamentais que regem o processamento de informação em uma rede neural baseada nas propriedades dinâmicas complexas dos neurônios? Como a arquitetura das redes neurais organiza o comportamento complexo dos componentes individuais em padrões de atividade regular? Como pode ser descrita tanto qualitativamente quanto quantitativamente a atividade de uma rede neural capaz de realizar tarefas de modo robusto, confiável e adaptável?

Muitos progressos na direção de responder essas questões básicas da neurociência foram conseguidos aplicando-se as idéias e métodos da teoria de sistemas dinâmicos não-lineares (Abarbanel, 1996; Rinzel & Ermentrout, 1998; Gilmore, 1998; Emlen *et al.*, 1998; Holden, 1997). A teoria dos sistemas dinâmicos fornece bases sólidas para a análise de certos aspectos dos mecanismos neurais tanto em nível de modelagem, como em experimentos. Utilizando esta abordagem para analisar o comportamento temporal de neurônios e redes neurais, podem ser observados (por exemplo) subsistemas trabalhando em diferentes escalas temporais, bifurcações entre diferentes modos de atividade, pontos fixos e ciclos limites, atividade irregular gerada por dinâmica de alta ou baixa dimensão e a influência de ruído. Algumas destas características dinâmicas foram utilizadas na identificação de certas propriedades “neuro-computacionais” das células (Izhikevich, 2000).

A atividade elétrica de um neurônio pode ser descrita detalhadamente pela contribuição de todas as condutâncias elétricas (dependentes do potencial, agentes químicos ou mecânicos) que compõe a membrana celular. Com os dados das condutâncias específicas dos canais iônicos e como elas dependem do potencial de membrana e das concentrações iônicas, é possível descrever a dinâmica de um neurônio de uma maneira biologicamente realista através de equações diferenciais acopladas (Hodgkin e Huxley, 1952).

Tendo em vista o grande número de equações não lineares acopladas (tipicamente >10) usadas para modelar um determinado tipo de neurônio, não é surpreendente que a atividade elétrica resultante se apresentasse de modo irregular e caótico. Os modelos da atividade elétrica de um neurônio baseados nas condutâncias da membrana celular tipo Hodgkin-Huxley (HH) têm tido grande sucesso na simulação do comportamento elétrico de alguns tipos de neurônio. Entretanto, quando valores experimentalmente realísticos (obtidos através de experimentos eletrofisiológicos) são substituídos nos parâmetros das equações diferenciais, o modelo HH, não é capaz de reproduzir o comportamento caótico observado experimentalmente. Apenas após a incorporação de um modelo da troca de cálcio entre o retículo endoplasmático e o meio intracelular (Li *et al.*, 1997), foi possível reproduzir as oscilações caóticas e irregulares encontradas nas células vivas (Falcke *et al.*, 2000). Ainda não se tem provas experimentais que a troca de cálcio no meio intracelular realmente ocorra na mesma escala temporal que as variações do potencial de membrana da célula nos neurônios vivos, muito menos que seja responsável pelo aparecimento de caos na atividade elétrica celular, mas vários experimentos estão sendo realizados para verificar esta hipótese (Levi *et al.*, 2003).

Os modelos HH que descrevem os detalhes do funcionamento desses neurônios considerando o movimento dos diferentes íons envolvidos na produção do potencial de membrana chegam a possuir facilmente mais de uma dezena de variáveis dinâmicas (Falcke *et al.*, 2000) e o estudo da interação entre vários destes neurônios pode levar rapidamente a uma complexidade desconcertante e praticamente intratável de modo analítico ou mesmo em simulações computacionais. Entretanto, estes neurônios e sinapses devem apresentar uma dinâmica intrínseca adequada para produzir padrões espaço-temporais simples quando conectados e, portanto, devem possuir um número ponderado de graus de liberdade - nem muito pequeno (tornando as operações inflexíveis), nem muito grande (produzindo instabilidades ou comportamento estocástico). De fato, análises topológicas da atividade de neurônios

isolados (reconstrução do espaço de fase) mostraram que a dinâmica pode ser descrita adequadamente usando-se apenas de 4 a 5 graus de liberdade (Rabinovich *et al.*, 1997).

Assim, é possível obter-se alguma visão geral dos processos neurais usando-se “caricaturas” de neurônios (Marder e Selverston, 1992), ou seja, modelos baseados em equações simplificadas, como o de Fitzhugh (1961), Morris e Lecar (1981) ou Hindmarsh e Rose (HR) (1984) (Kepler *et al.*, 1990; Skinner *et al.*, 1994; Abarbanel *et al.*, 1996, Manor *et al.*, 1999). Tais modelos simplificados são muito úteis para o estudo de redes neurais compostas por vários desses componentes e suas interconexões, pois o número reduzido de equações pode ser simulado muito mais rapidamente em um computador e também permitem a implementação de circuitos eletrônicos analógicos (integradores) que emulam o potencial de membrana da célula (Pinto *et al.*, 2000). Esses “neurônios eletrônicos”, quando sintonizados adequadamente, não apenas comportam-se de maneira similar aos neurônios biológicos mas também são capazes de responder a estímulos em tempo real, podendo ser conectados aos neurônios biológicos formando circuitos mistos ou substituindo células biológicas danificadas (Szücs *et al.*, 2000).

A representação matemática do comportamento elétrico de neurônios usando modelos dinâmicos que, baseados em medidas experimentais eletrofisiológicas, permitem manipular a dinâmica de condutâncias específicas e testar diferentes hipóteses sobre o comportamento do neurônio isolado, constitui uma poderosa ferramenta para estudar muitas questões de interesse em neurociência. Entre elas podemos ressaltar: como as condutâncias individuais moldam o comportamento de uma célula ou qual é a importância de cada uma das propriedades individuais dos neurônios na determinação do comportamento global de uma rede neural complexa (Marder, 1998). Mesmo nas menores e mais simples redes neurais biológicas estas questões estão longe de serem respondidas porque os próprios neurônios são sistemas altamente complexos e não-lineares (Holden, 1997; Rinzel & Ermentrout, 1998; Izhikevich, 2000).

Modelos matemáticos realistas da atividade dos neurônios, além de constituir uma maneira de testar diversas hipóteses (muitas vezes impossíveis de testar em um neurônio vivo) sobre os processos que colaboram para produzir um comportamento experimental particular, podem ser usados para fazer previsões e orientar experimentos que revelem novas propriedades das células (Marder, 1998; Dayan & Abbott, 2001).

Esta troca de informações entre experimentos com neurônios vivos e modelos matemáticos pode abrir muitas novas possibilidades. Entre outras aplicações, modelos analógicos ou modelos de neurônios virtuais, integrados em tempo real em computadores digitais, podem interagir com tecido vivo e produzir redes neurais híbridas (Szücs *et al.*, 2000; Pinto *et al.*, 2000; Prinz, 2004) que podem auxiliar a compreender melhor como as redes biológicas funcionam (Selverston *et al.*, 2000), restaurar circuitos danificados (Szücs *et al.*, 2000), construir circuitos com novas propriedades (Ayers, 2004), ou até alimentar uma rede neural viva com dados sensoriais vindos de dispositivos artificiais comandados pela rede biológica como acontece nas interfaces cérebro-máquina (Nicoletis, 2003). É neste efervescente contexto multidisciplinar que apresentamos a presente tese.

2. No princípio era o Caos

Podemos dividir o estudo dos sistemas não lineares em três grandes blocos:

a) Caracterização: o cálculo dos expoentes de Lyapunov, a determinação dos pontos fixos utilizando caracterização topológica, o cálculo da dimensão fractal, as funções de autocorrelação, os espectros de potência, as diversas entropias, etc., permitem quantificar a complexidade de um sistema e comparar diferentes comportamentos. Ainda hoje, a caracterização do comportamento de um sistema é um assunto bastante delicado, e muitos métodos diferentes têm que ser aplicados e confrontados para obter conclusões definitivas;

b) Dinâmica: o estudo de rotas para o caos e a aplicação da caracterização topológica e da teoria de bifurcações de sistemas dinâmicos determinam como um sistema evolui de um comportamento periódico ordenado para um comportamento caótico;

c) Controle: as técnicas que permitem o controle de sistemas não lineares, explorando a adaptabilidade dos sistemas caóticos, constituem um campo de pesquisa aplicada em expansão.

Durante meu doutoramento, estas abordagens da teoria de sistemas não lineares foram aplicadas ao estudo da formação de gotas de água em uma torneira, um sistema aparentemente simples de ser construído, entretanto capaz de apresentar uma riqueza impressionante de comportamentos não-lineares.

2.1 – Dinâmica de formação de gotas d'água: a “torneira gotejante”

Rössler (Rössler, 1977) sugeriu que o gotejamento de uma torneira poderia ser um exemplo de sistema que apresenta comportamento caótico. A partir de 1984, com o trabalho de Shaw (Shaw, 1984), diversos grupos reproduziram o experimento (Martien *et al.*, 1985; Núñez-Yépez *et al.*, 1989; Wu e Schelly, 1989; Cahalan *et al.*, 1990; Dreyer e Hickey, 1990), e observaram comportamentos complexos, duplicações de período, bifurcações de vários tipos, etc. Na tentativa de explicar os fenômenos observados nesta experiência, foram construídos modelos muito simples e limitados. Martien *et al.* (Martien *et al.*, 1985) conseguiram simular, em um computador analógico, alguns atratores experimentais usando um modelo em que as equações hidrodinâmicas são simplesmente substituídas pelas equações de um sistema massa-mola: à medida que o volume de água preso ao bico da torneira aumenta, sua frequência de vibração diminui, até que atinge um ponto crítico, arbitrariamente escolhido, onde uma porção de água desprende-se do bico, formando uma gota, que

impõe as condições iniciais para a próxima gota. *De Oliveira e Penna* (de Oliveira e Penna, 1994) simularam alguns comportamentos experimentais usando o método de Monte Carlo em um modelo tipo Ising bidimensional onde são consideradas a tensão superficial e uma atração tipo Van der Waals, além da força gravitacional, para determinar o instante de formação das gotas.

A riqueza de comportamentos não lineares e o desafio representado pela ausência de modelos teóricos satisfatórios torna esta experiência um modelo de sistema dinâmico experimental muito interessante que, apesar da sua aparente simplicidade, exige uma abordagem experimental sofisticada para a obtenção de dados de alta qualidade.

Existiam algumas evidências de que a torneira gotejante apresentava comportamento caótico, como algumas bifurcações que poderiam ser trechos de rotas para o caos (Dreyer e Hickey, 1990), a aparência e a baixa dimensionalidade dos atratores reconstruídos (Martien, 1985). Entretanto, até o início de meu doutoramento, a maioria dos trabalhos experimentais com a torneira gotejante apresentava uma análise de dados qualitativa, baseada na aparência dos atratores reconstruídos. Ainda não havia sido demonstrado se a torneira gotejante apresentava comportamento caótico ou se a complexidade dos atratores observados era apenas produto do ruído experimental. A falta de resultados quantitativos devia-se à dificuldade de obter dados com qualidade e em quantidades suficientes para que os métodos de caracterização (Abarbanel, 1993) produzissem resultados confiáveis.

O ruído presente nos sistemas experimentais, por menor que seja, é suficiente para fazer com que um sistema estruturalmente instável se transforme em outro que seja estável, ou fique transitando entre um e outro, não permitindo observar a dinâmica com detalhe suficiente para a caracterização. De acordo com a teoria matemática da estabilidade estrutural dos sistemas dinâmicos e bifurcações, só é possível observar sistemas dinâmicos experimentais estruturalmente estáveis, e é difícil encontrar sistemas dinâmicos estruturalmente estáveis com dimensão maior que 2 (Abraham e Shaw, 1992). Assim, pode-se ter uma idéia do desafio que representou a construção de um aparato experimental em que foi possível observar fenômenos não lineares em dimensões maiores que 2.

O objetivo de meu projeto de doutoramento foi o desenvolvimento das ferramentas experimentais e computacionais necessárias para obter dados com qualidade e em quantidades suficientes para permitir a utilização dos métodos de caracterização de dados de sistemas não lineares, determinar as possíveis rotas para o caos presentes no sistema e estudar a aplicação de métodos de controle de caos, contribuindo assim, para uma melhor compreensão dos fenômenos experimentais turbulentos ou complexos.

2.2 – A evolução do aparato experimental e os resultados

Começamos com um aparato pequeno e bastante limitado (figuras 2.1 e 2.2) e no fim do doutorado estávamos com um aparato que praticamente ocupava duas salas (figuras 2.4 e 2.5), e que tornou possível a aquisição de dados ininterruptamente durante vários dias. Todo esse aparato, sem contar o computador de aquisição de dados e o laser de He-Ne, foi totalmente projetado, construído e modificado por nós mesmos, o que proporcionou muitas idéias de como obter diferentes medidas ou a melhoria da qualidade dos dados. Desenvolvemos um sistema hidráulico em circuito fechado e um sistema de aquisição de dados automatizado, que também controla a abertura da torneira (uma válvula de agulha). Utilizamos como parâmetro de controle para a obtenção de dados a taxa de gotejamento estabelecida pela abertura da torneira. Os dados são séries de tempos $\{T_n\}$ entre gotas sucessivas para cada taxa de gotejamento. Paralelamente, também procuramos desenvolver os métodos de caracterização e análise, de tal modo que fosse possível confrontar os resultados obtidos por vários métodos diferentes.

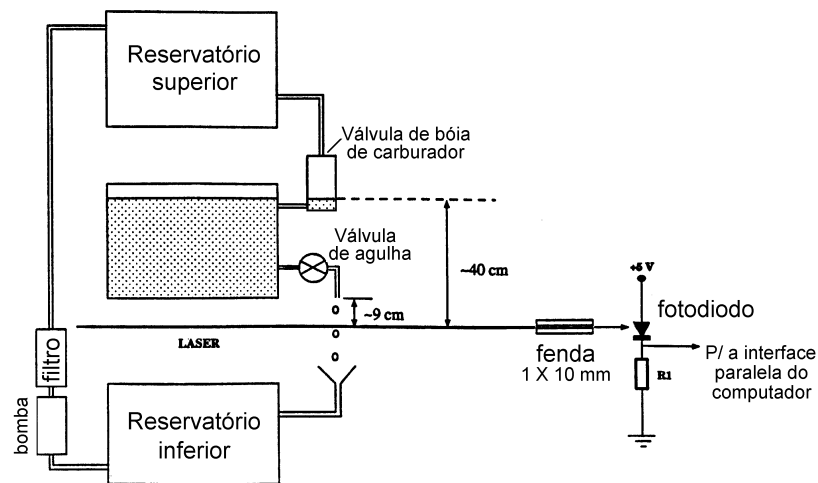


Figura 2.1: Diagrama do primeiro aparato experimental para o estudo da dinâmica não-linear de formação de gotas d'água.

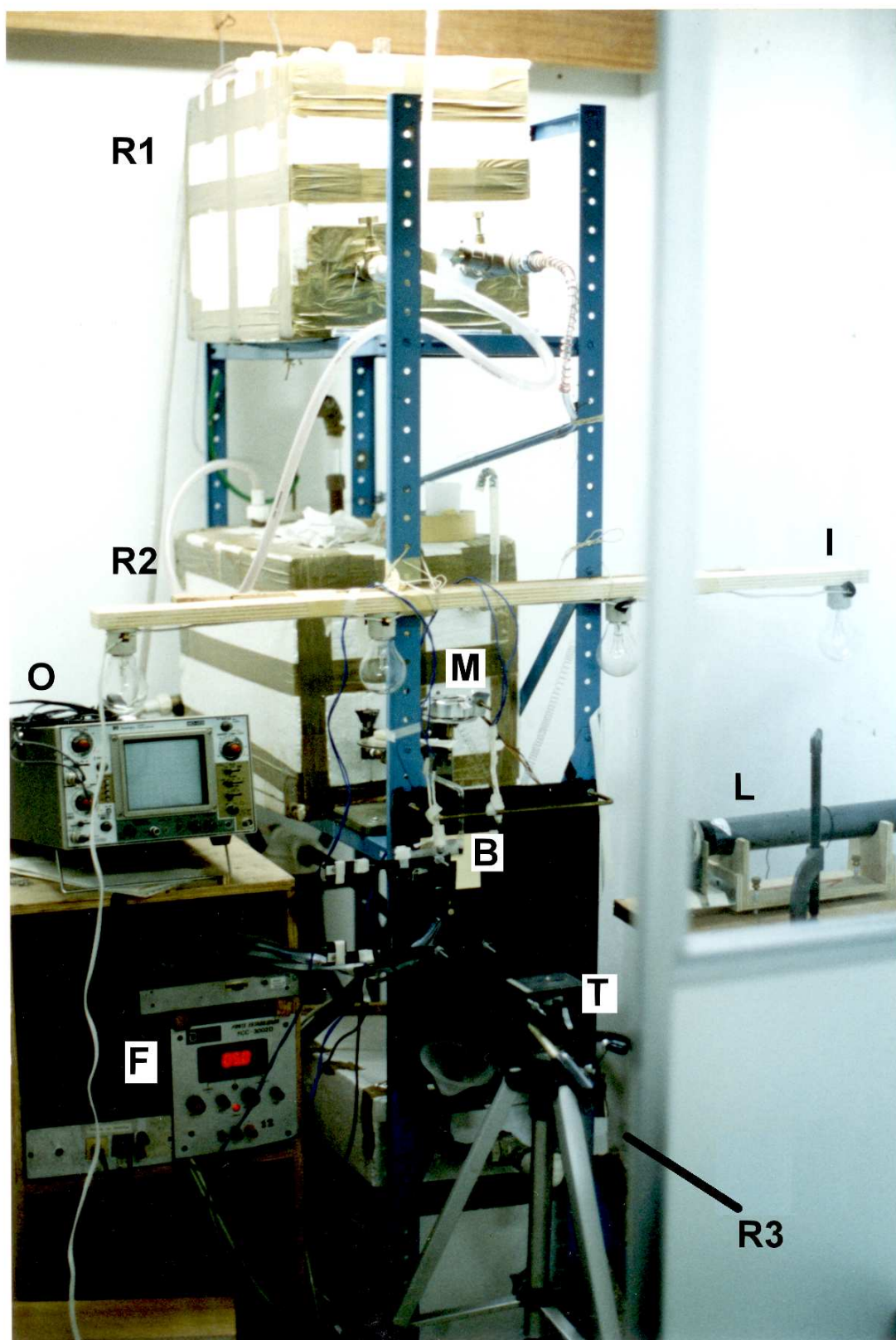


Figura 2.2 - O primeiro aparato experimental: R1 - reservatório superior, R2 - reservatório intermediário, R3 - reservatório inferior, M - motor de passo e válvula de agulha, L - laser, B - bico da torneira e fotodiodo detetor, F - fonte de alimentação e circuitos eletrônicos, O - osciloscópio usado para alinhamento do conjunto laser-fotodiodo, T - tripé utilizado para filmagem, I - régua de iluminação para filmagem.

A estacionariedade das séries temporais obtidas com este primeiro aparato era muito limitada, principalmente pela inércia da bóia do sistema de nível constante (adaptado de um carburador de automóvel) e pelo pequeno volume de água disponível. Medidas feitas deixando o nível do reservatório abaixar naturalmente, conforme as gotas saíam da torneira, mostraram que o sistema é sensível a variações de nível muito pequenas, da ordem de 10^{-3} mm, produzidas por dezenas de gotas como mostrado na Fig. 2.3. Essa bifurcação só seria vista com tamanho detalhe usando-se o sistema de nível constante, se a altura do reservatório fosse mantida com uma precisão de 10^{-3} mm durante a aquisição de uma série (30 min), porém, uma flutuação do nível de ~ 1 mm era observada no mesmo intervalo de tempo.

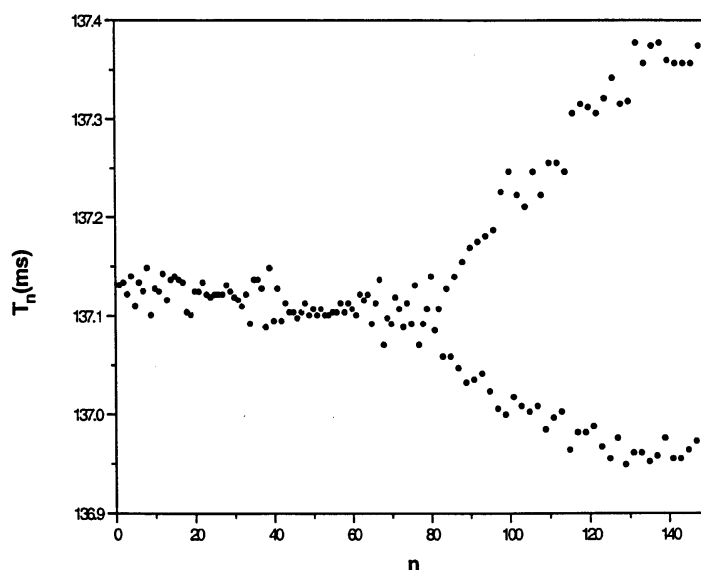


Figura 2.3 - Trecho de um diagrama de bifurcações de uma série de dados em que o nível vai abaixando à medida em que as gotas saem da torneira. A bifurcação observada ocorre para uma variação do nível de 10^{-3} mm.

A inércia da bóia do sistema de nível constante permitia variações da ordem de milímetros e o pequeno volume da caixa d'água de nível constante não possibilitavam adquirir séries de dados longas com o parâmetro de controle (vazão média). Outra limitação do número de dados das séries de uma seqüência era imposta pelo volume da caixa superior. O volume total das gotas não poderia ultrapassar os 40 litros úteis (~ 400.000 gotas) do reservatório superior, pois após este reservatório ser esvaziado, o nível d'água do reservatório de medida não era mais mantido constante. Este problema não podia ser resolvido pelo bombeamento automático da água destilada quando o reservatório se esvaziasse porque este bombeamento gerava uma enorme perturbação no sistema.

O sistema também era muito sensível às vibrações mecânicas, deteriorando a qualidade dos dados. Por isso, a tomada de dados era feita principalmente nos horários da madrugada em fins de semana prolongados.

Parâmetros importantes para determinar como as gotas se formavam como a viscosidade e a tensão superficial da água têm uma forte dependência das impurezas nela dissolvidas. O próprio corpo metálico do carburador após um longo tempo

oxidava e desprendia impurezas. Todo o sistema tinha que ser lavado e reabastecido, mesmo com a utilização de água destilada.

A impossibilidade de adquirir séries de dados longas com alta relação sinal/ruído, e a necessidade de uma caracterização mais completa dos atratores, calculando os expoentes de Lyapunov, nos levaram à primeira remodelação completa do aparato experimental e a novas remodelações que foram ocorrendo à medida em tínhamos novas idéias ou deparávamos com outras limitações.

O diagrama que apresenta o aparato com que terminei a tese de doutoramento encontra-se na figura 2.4. Os vários reservatórios e sistemas eletrônicos ocupavam praticamente 2 salas do laboratório, conforme mostrado nas figuras 2.5 a 2.7, além de parte do telhado (onde foi montado o reservatório superior).

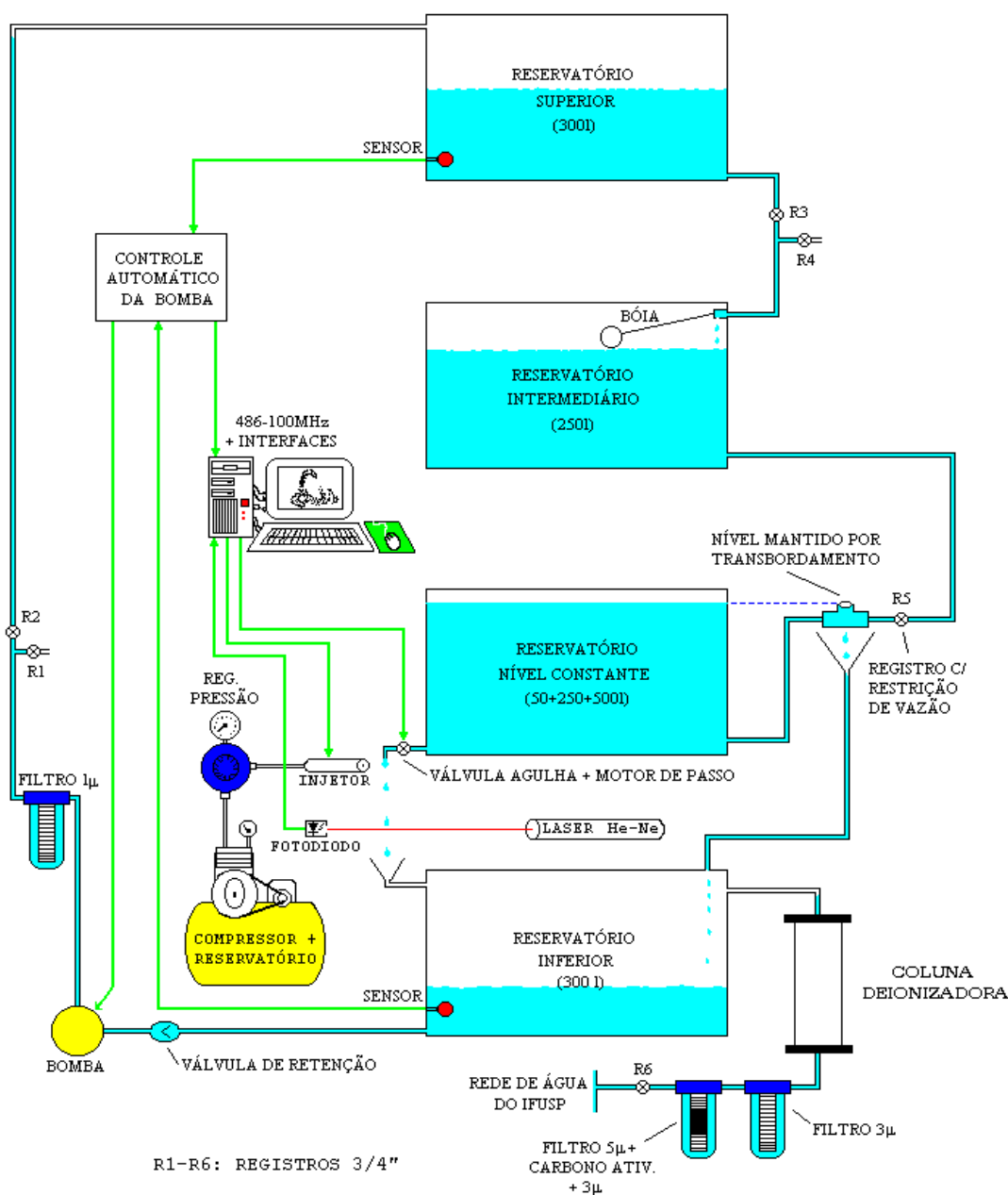


Figura 2.4: Diagrama do aparato experimental na época da conclusão da tese de doutoramento.

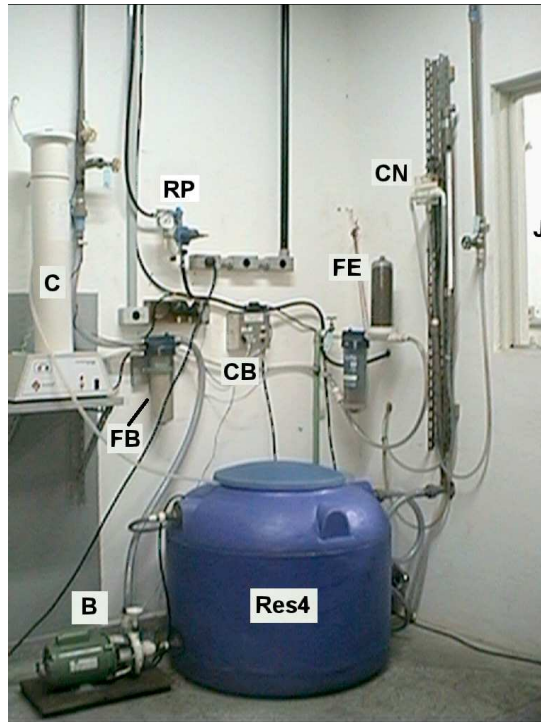


Figura 2.5 – O último aparato experimental. FE - filtros de entrada de água da rede. C - coluna deionizadora. Res4 - reservatório inferior (300 l). B - bomba d'água em material não oxidante. FB - filtro de 1 μ . CB - circuito de bombeamento automático. CN - sistema de controle de nível por transbordamento. RP - regulador de pressão para a válvula injetora. J - janela para a sala isolada onde são feitas as medidas.

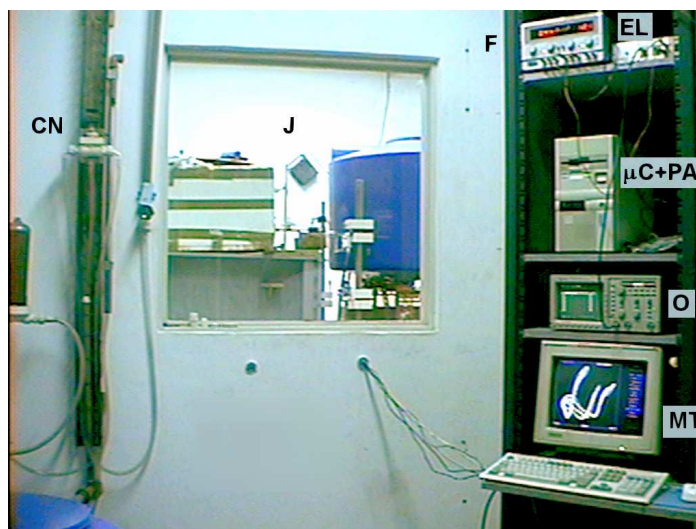


Figura 2.6 – O último aparato experimental. CN - sistema de controle de nível por transbordamento. J - janela para a sala isolada onde são feitas as medidas. F - fonte de alimentação para os circuitos eletrônicos. EL - circuitos eletrônicos de controle do motor, controle da válvula injetora de ar comprimido e condicionamento do sinal do fotodiodo. μ C+PA - microcomputador 486 DX4-100 MHz com placa de aquisição automática de intervalos. O - osciloscópio para alinhamento do sistema laser-fotodiodo com as gotas em queda. MT - monitor e teclado (visualização de atratores em tempo real e controle da aquisição de dados).

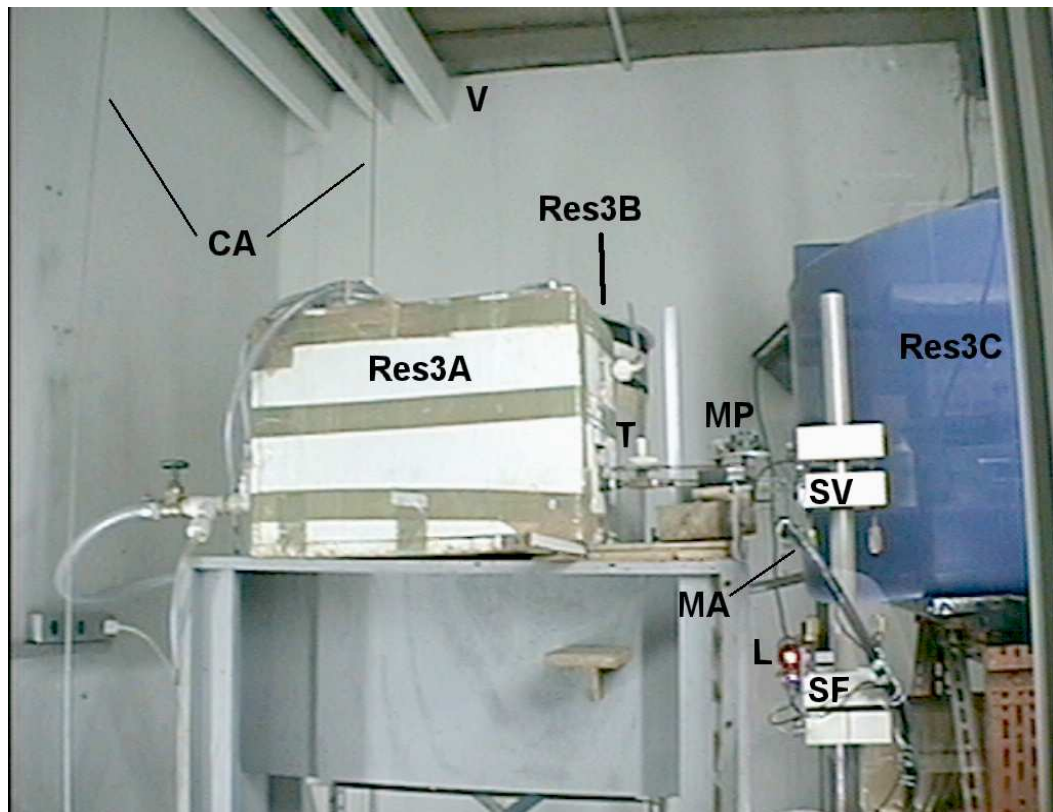


Figura 2.7 - Parte do aparato montada sobre a plataforma suspensa na sala isolada. Reservatório de nível constante: Res3A (50 l), Res3B (250 l), Res3C (500 l). V - vigas de sustentação da parte traseira da plataforma. CA - cabos de aço de sustentação. T - torneira formada pela válvula de agulha e tubo de vidro. L - laser. SF - suporte ajustável com o fotodiodo detetor. SV - suporte ajustável com a válvula injetora de ar comprimido. MA - mangueira de ar comprimido para alimentação da válvula injetora. MP - motor de passos.

Com a construção de uma plataforma suspensa para minimizar a transmissão de vibrações externas para o aparato e juntamente com um sistema de controle do nível d'água minimizamos os problemas de estabilidade das séries de dados, e com o desenvolvimento de uma placa contadora melhoramos a relação sinal/ruído dos dados. Esta placa permite que o microcomputador faça os cálculos necessários para a aplicação de técnicas de controle e anticontrole de caos, durante a tomada de dados (em tempo real) e também permite aplicar uma técnica para perturbar a formação das gotas, durante a aquisição de dados, aplicando pulsos rápidos de ar comprimido na direção do bico da torneira.

Nas figuras 2.8 e 2.9 comparamos a sequências de atratores obtidos para a mesma região de vazão quando abrimos a torneira em uma região próxima de 40 gotas/s usando o primeiro e o último aparato experimental respectivamente. Na figura 2.8 cada atrator é composto por uma sequência de 1024 intervalos entre gotas (após um transiente de 10 segundos) e na figura 2.9 cada atrator é composto por 16384 intervalos de tempo entre gotas (após um transiente de 16384 gotas). A figura 2.10 mostra uma outra sequência de atratores entre um período cinco até uma transição para menores taxas de vazão quando fechamos a torneira.

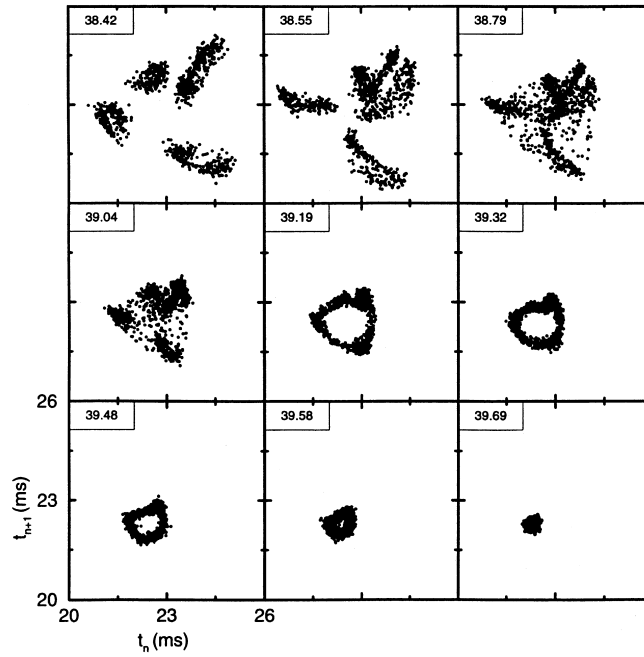


Figura 2.8 – Qualidade dos dados no primeiro aparato: seqüência de atratores reconstruídos a partir de séries com 1024 intervalos entre gotas em alta vazão. No canto superior esquerdo de cada atrator é mostrada a vazão média em gotas/s.

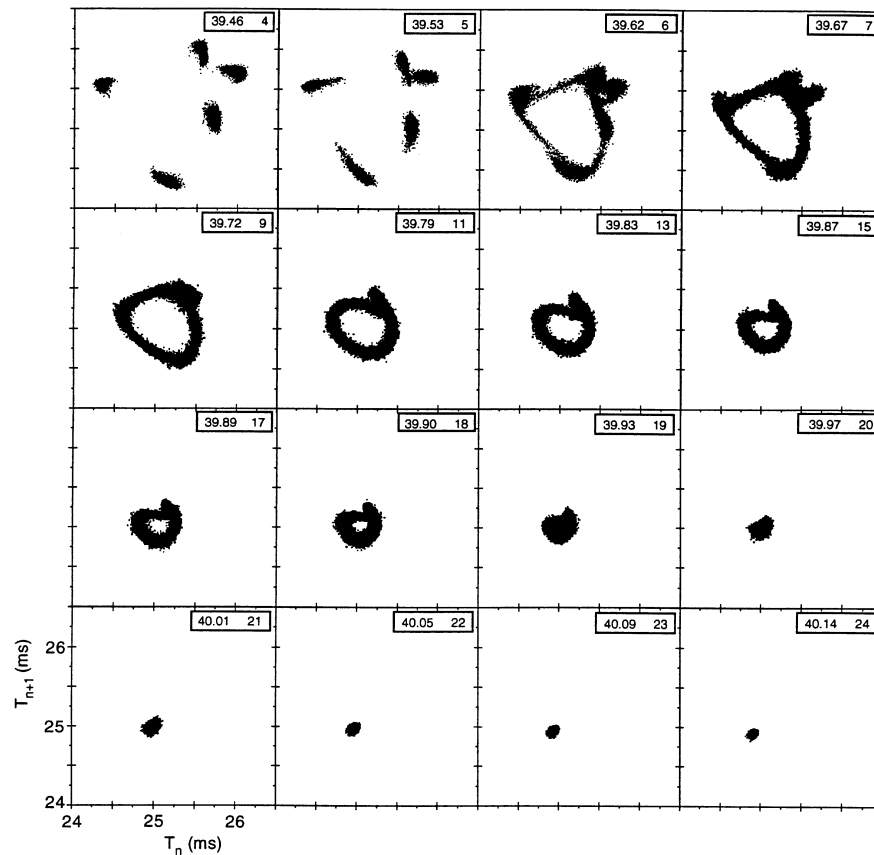


Figura 2.9 – Qualidade dos dados no último aparato: atratores reconstruídos (T_{n+1} vs. T_n) para 16 séries de dados de 16384 gotas cada uma com a torneira sendo aberta um passo entre séries. No canto superior direito encontram-se a frequência de gotejamento e o número de ordem do atrator (numero de passos abrindo a torneira).

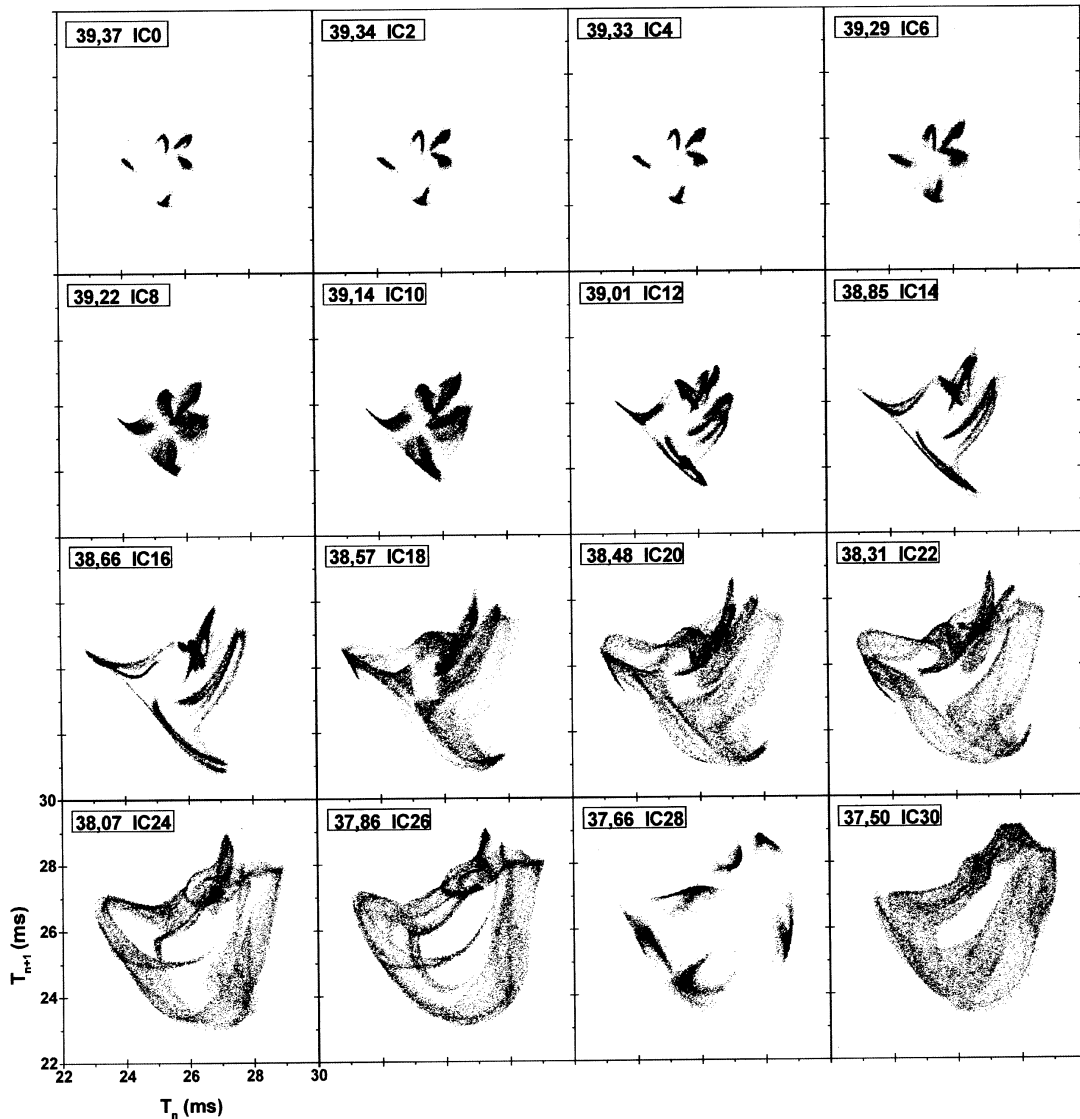


Figura 2.10 – Qualidade dos dados do último aparato: atratores reconstruídos em séries de dados com 32768 intervalos de tempo entre gotas começando em um período 5 e fechando a torneira até o limite de uma transição abrupta para menores vazões identificada como uma “chaotic blue sky catastrophe”. Em vários atratores são observadas linhas finíssimas, atestando a boa relação sinal/ruído que obtivemos com as constantes remodelações do aparato.

Durante o desenvolvimento do projeto, além de investirmos muito tempo e esforço para obter um sistema experimental onde pudéssemos obter dados confiáveis e de alta reprodutibilidade também procuramos desenvolver novas ferramentas e métodos de análise como a caracterização topológica (Abraham e Shaw, 1992) e a dinâmica simbólica (Zhao e Zheng, 1993). Assim, pudemos confrontar os resultados obtidos por vários métodos diferentes e a utilização de técnicas gráficas alternativas para analisar a topologia dos atratores.

Na figura 2.11 mostramos um diagrama de bifurcação do experimento da torneira gotejante para ilustrar alguns dos principais resultados obtidos durante meu doutoramento e a região a que se referem. Aproximadamente 220000 intervalos entre gotas foram medidos com a vazão aumentando partindo de médias taxas de vazão até atingir o fluxo contínuo.

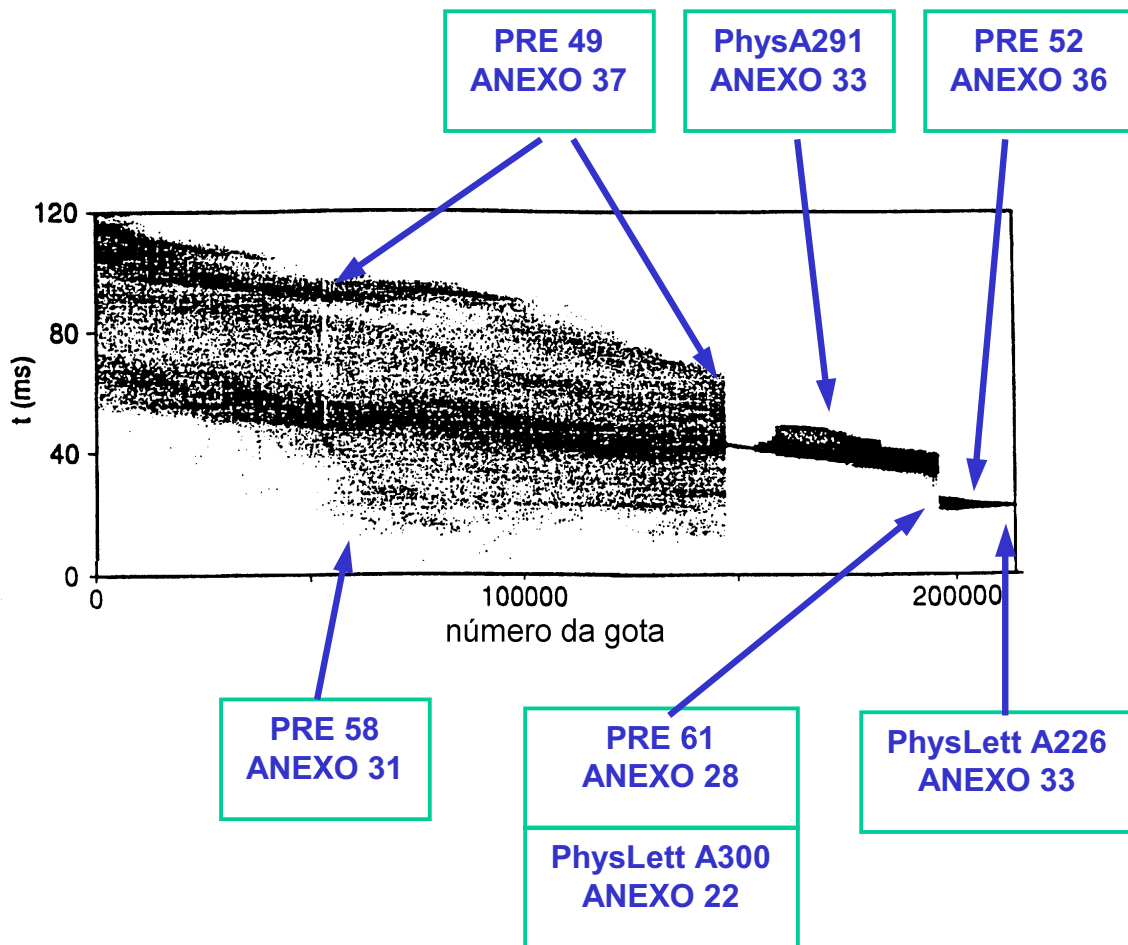


Figura 2.11 – Diagrama de bifurcação do intervalo entre gotas com vazão crescente para ilustrar os principais resultados e a região a que se referem.

Logo no começo do trabalho, utilizando reconstrução do espaço de fase, mapas de primeiro retorno $T_{n+1} \times T_n$, e métodos de caracterização topológica, como o mapeamento de pequenas regiões do espaço de fase reconstruído, caracterizamos atratores que apresentavam crises (interiores e de fronteira) e intermitências quando variávamos a taxa de gotejamento (Sartorelli *et al.*, 1994, ANEXO 37), mostramos também a ocorrência de uma bifurcação de Hopf e vários movimentos quase-periódicos nos atratores e desenvolvemos um método para encontrar as componentes de Farey que caracterizam os movimentos quase-periódicos. (Pinto *et al.*, 1995, ANEXO 36).

Com o acompanhamento de órbitas, em espaços de fase reconstruídos, verificamos a existência de pontos de sela em vários atratores experimentais. Estes pontos de sela foram confirmados pelo método algébrico de obtenção da posição de pontos fixos instáveis imersos nos atratores, chamado “transformação do ponto fixo” (So *et al.*, 1996; So e Ott, 1995). Com a aplicação de dinâmica simbólica, observamos tangências homoclínicas entre as variedades de alguns desses pontos de sela, associadas ao aparecimento de atratores de Hénon e bifurcações homoclínicas. Determinamos duas rotas para o caos que envolvem o aparecimento suave de caos devido à essas bifurcações homoclínicas (Pinto *et al.*, 2000a, ANEXO 28; Pinto *et al.*,

2001a, *ANEXO 25*) e heteroclínicas (Pinto *et al.*, 1998, *ANEXO 31*). Mostramos também, que a dinâmica de formação de gotas apresenta as mesmas anticorrelações de longo alcance observadas em dados experimentais de intervalos entre batidas do coração em indivíduos sadios (Penna *et al.*, 1995, *ANEXO 35*).

Aplicando pequenas perturbações à formação de uma determinada gota, desenvolvemos um método experimental de mapeamento da dinâmica nas proximidades dos atratores, com o qual pudemos observar a evolução do espaço de fase quando variamos a vazão e a inclinação do bico da torneira. Definimos uma rota para o caos, em altas taxas de vazão, na qual o sistema sai de um atrator periódico e, através de bifurcações locais e tangências homoclínicas, evolui para um atrator caótico. Verificamos que a evolução desse atrator caótico leva a uma bifurcação, que ainda não havia sido observada experimentalmente (Pinto *et al.*, 2000a, *ANEXO 28*), chamada “*Chaotic Blue Sky Catastrophe*” (Abraham e Stewart, 1986; Abraham e Shaw, 1992), presente num modelo de oscilador amortecido desenvolvido por *Van der Pol* (*apud* Argyris *et al.*, 1994) para simular a dinâmica cardíaca.

Iniciamos a aplicação de técnicas experimentais de controle e anticontrole de caos aos atratores da torneira gotejante e obtivemos resultados preliminares bastante animadores. Aplicamos um método de anticontrole de caos para desestabilizar um ponto fixo estável que aparece no espaço de fase após a ocorrência de uma crise interior, na qual um atrator caótico colide com o ponto fixo estável. Observamos que a estrutura do atrator caótico ainda existe e é visitada pelo sistema enquanto mantemos o anticontrole ligado.

A familiaridade com a dinâmica apresentada pelos atratores experimentais nos levou a propor um modelo capaz de explicar muitas das características observadas. O modelo parte de duas hipóteses: fluxo médio e volume das gotas constantes, explica o sentido de rotação horário apresentado pelas órbitas de todos os atratores, e pode explicar as anticorrelações de longo alcance e o freqüente aparecimento de tangências homoclínicas (Pinto *et al.*, 2001a, *ANEXO 25*). Este modelo simplificado também era capaz de explicar o aparecimento de long-range anticorrelations que frequentemente eram associadas a sistemas vindos de processos evolutivos, o que certamente não era o caso da torneira gotejante.

Além desses trabalhos diretamente relacionados ao meu projeto de doutoramento, minha participação no desenvolvimento do aparato experimental e na implementação de técnicas de análise implicou em uma forte colaboração com os outros estudantes do grupo. Assim também fui co-autor de vários outros trabalhos. Desenvolvi um circuito contador de gotas com display de LEDs que permitiu correlacionar o tempo entre gotas com as imagens digitalizadas da formação da gota. Neste trabalho mostramos que a evolução do centro de massa das gotas apresenta duas fases, uma fase elástica de deformação linear do filete de água preso ao bico da torneira, seguida de uma fase plástica não-linear em que ocorre a quebra do filete e a separação da gota (Rocha *et al.*, 1996, *ANEXO 34*). Na região de alta vazão, próxima do fluxo contínuo da torneira, mostramos que a constante de decaimento da amplitude da função de autocorrelação do tempo entre gotas escala com a taxa de gotejamento (Silva *et al.*, 1997, *ANEXO 33*). A aplicação de análise simbólica aos dados experimentais foi amplamente utilizada para caracterizar o comportamento dinâmico das séries de dados (Gonçalves *et al.*, 1998, *ANEXO 32*; Gonçalves *et al.*, 1999, *ANEXO 30*). Também colaborei com um estudante que trabalhou com simulação de dados usando mapas combinados e comparou seus resultados com atratores experimentais (Tufaile *et al.*, 1999, *ANEXO 29*). Meus resultados preliminares estudando os efeitos da inclinação do bico da torneira em uma transição brusca entre

atratores (Pinto *et al.*, 2000a, *ANEXO 28*) serviram de base para o trabalho de mestrado do estudante Marcelo Reyes que mostrou a presença de caos heteroclínico quando o bico é inclinado (Reyes *et al.*, 2002, *ANEXO 22*).

De um modo geral, foi a evolução concomitante das técnicas experimentais e de análise de dados, que permitiu obter essa grande quantidade de resultados e abriu muitas possibilidades de trabalhos futuros na própria experiência da torneira gotejante e em outras áreas.

2.3 – A “transição” para a neurociência

As técnicas desenvolvidas para tratar os dados obtidos com o experimento da torneira aplicam-se à muitos outros sistemas dinâmicos experimentais onde foram encontrados comportamentos dinâmicos semelhantes, como: os dados de intervalos entre batidas cardíacas (Peng *et al.*, 1993), a dinâmica “íntegra e dispara” das redes neurais biológicas (Schiff *et al.*, 1994a) e o comportamento social de colônias de formigas (Bonabeu *et al.*, 1998), entre outros. A aplicação destas técnicas em sistemas dinâmicos biológicos sempre pareceu muito interessante.

Uma das principais ferramentas utilizadas em meu trabalho foi a reconstrução do espaço de fases dos atratores experimentais (Takens, 1981) que, entretanto, só teve uma justificativa rigorosa quando o doutoramento já se encontrava a meio caminho andado. O teorema de reconstrução de Takens permite reconstruir um atrator topologicamente equivalente ao atrator original usando um vetor construído com coordenadas obtidas de uma série temporal de uma única variável do sistema dinâmico medida a intervalos de tempo constantes.

Muitos sistemas dinâmicos experimentais, entretanto, não permitem sequer a escolha do tempo de amostragem da variável acessível, como acontece quando se medem séries de intervalos de tempo entre eventos, como por exemplo gotas que caem de uma torneira, disparos de neurônios, batidas de um coração, entre outros. Inspirado em sistemas deste tipo, *T. Sauer* (Sauer, 1997) trabalhou em uma generalização do teorema de *Takens*, mostrando que o mesmo tipo de técnica pode ser aplicado a sistemas com dinâmica do tipo “íntegra e dispara”.

Na Fig. 2.12(a) mostramos uma série de intervalos entre disparos obtida para o atrator de Lorenz usando apenas a variável x de acordo com

$$\int_{T_i}^{T_{i+1}} S(t) dt = \theta, \quad (2.1)$$

$$S(t) = (x(t) + 2)^2,$$

onde $\theta=60$ é o limiar de disparo utilizado nos cálculos. O atrator de Lorenz reconstruído usando a série de disparos é mostrado na Fig. 2.12(b).

Em sua generalização, Sauer mostrou que o bom resultado da reconstrução não depende da função S , que pode ser qualquer, desde que bem comportada, contínua, etc... Assim, todas as técnicas de análise de dados que desenvolvi durante o doutoramento serviam praticamente sem nenhuma adaptação aos dados obtidos em experimentos com redes neurais biológicas. Bastava substituir as séries de dados de intervalos entre gotas consecutivas pelas séries de dados entre disparos de potenciais de ação consecutivos. Essa similaridade me impeliu a procurar trabalho nos vários

grupos de pesquisa que trabalhavam com sistemas dinâmicos e redes neurais biológicas e fez com que eu me envolvesse definitivamente nos fascinantes desafios multidisciplinares da neurociência.

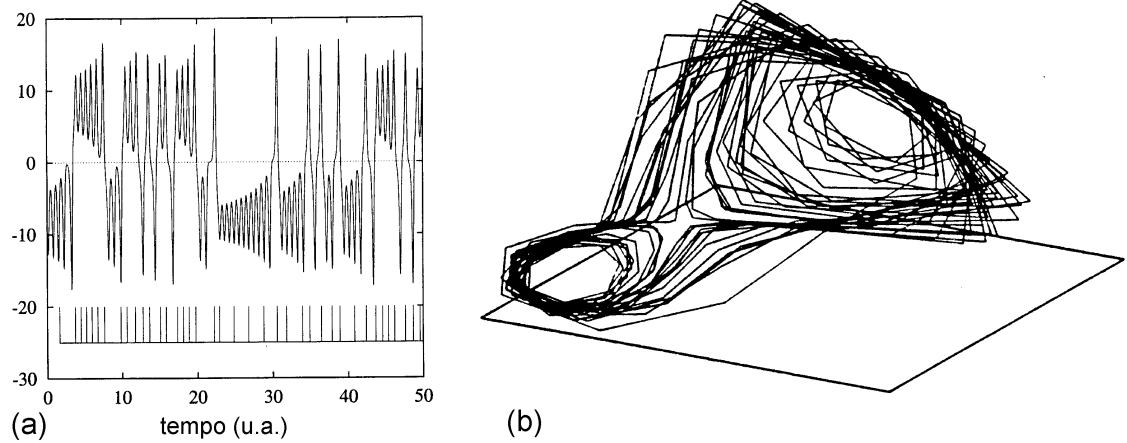


Figura 2.12 - (a) No traço superior é mostrado o gráfico dos valores da variável X do sistema de Lorenz e no traço inferior a série de disparos gerada a partir da eq. (2.1). (b) Atrator de Lorenz reconstruído usando os intervalos entre disparos da dinâmica íntegra e dispara. Adaptada de *Sauer*, 1997.

3. O Sistema Nervoso Estomatogástrico dos Crustáceos

Crustáceos são artrópodes (decápodos) e estão entre os invertebrados mais populares em neurociência experimental. O interesse experimental por esses animais vem do fato de não mastigarem sua comida oralmente. Para escapar dos predadores, engolem rapidamente o alimento inteiro e retornam ao abrigo ou esconderijo, onde seu estômago adaptado (possuí dentes e musculatura especializada) executa a mastigação. O gânglio estomatogástrico (STG), é o responsável pela geração e controle dos ritmos de contração do estômago e dos dentes gástricos.

O STG contém aproximadamente 30 neurônios e, quando isolado experimentalmente do corpo do animal, continua a gerar os padrões de atividade rítmica complexa que controlam os músculos do estômago produzindo praticamente os mesmos padrões observados nos animais intactos, desde que se mantenha a conexão com os gânglios superiores que fornecem sinais moduladores.

Na Figura 3.1 é mostrada a anatomia externa básica do estômago de um siri *Callinectes sapidus*. O estômago é um grande saco com quatro aberturas – o esôfago que conecta a boca localizada ventralmente ao estômago, uma abertura para o intestino médio e um par de dutos laterais que conectam-se ao hepatopâncreas. O estômago é compartimentalizado em três seções (Figura 3.2): uma região cardíaca, que funciona como um depósito para o alimento, um conjunto de três dentes chamado de moela gástrica, onde o alimento é mastigado e uma região pilórica, onde as partículas de comida são separadas por filtração e enviadas ao intestino médio ou aos dutos do hepatopâncreas.

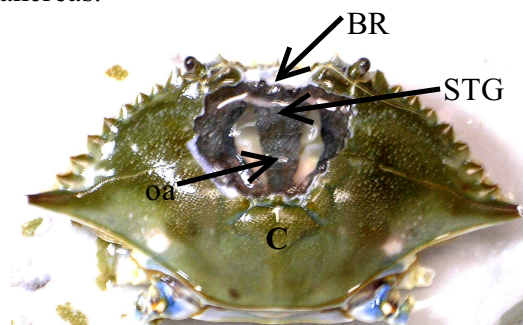


FIGURA 3.1 Vista dorsal do tórax de um siri azul *Callinectes sapidus*, do qual foi removido parte do exoesqueleto e foram feitos dois cortes na pele, para expor as laterais do estômago. O estômago é um grande saco suspenso no interior do tórax por músculos que originam-se na parede torácica. O gânglio estomatogástrico (STG) encontra-se abaixo da pele onde indicado na figura, dentro da artéria oftálmica (oa), que liga o coração (C) ao cérebro (BR).

A parte do sistema nervoso que controla o esôfago e o estômago consiste de dois gânglios comissurais (CG) que formam protuberâncias nos conectivos circumesofágicos quando estes passam pelo esôfago, um pequeno gânglio esofágico (OG) localizado na superfície anterior do esôfago e um gânglio estomatogástrico (STG) localizado na superfície dorsal do estômago, dentro da artéria oftálmica. Na Figura 3.2 é mostrado um esquema com a localização dos vários gânglios do sistema nervoso estomatogástrico. O OG conecta-se diretamente ao gânglio supraesofágico (cérebro) através do nervo ventricular inferior (IVN), e ao STG através do nervo estomatogástrico (SGN).

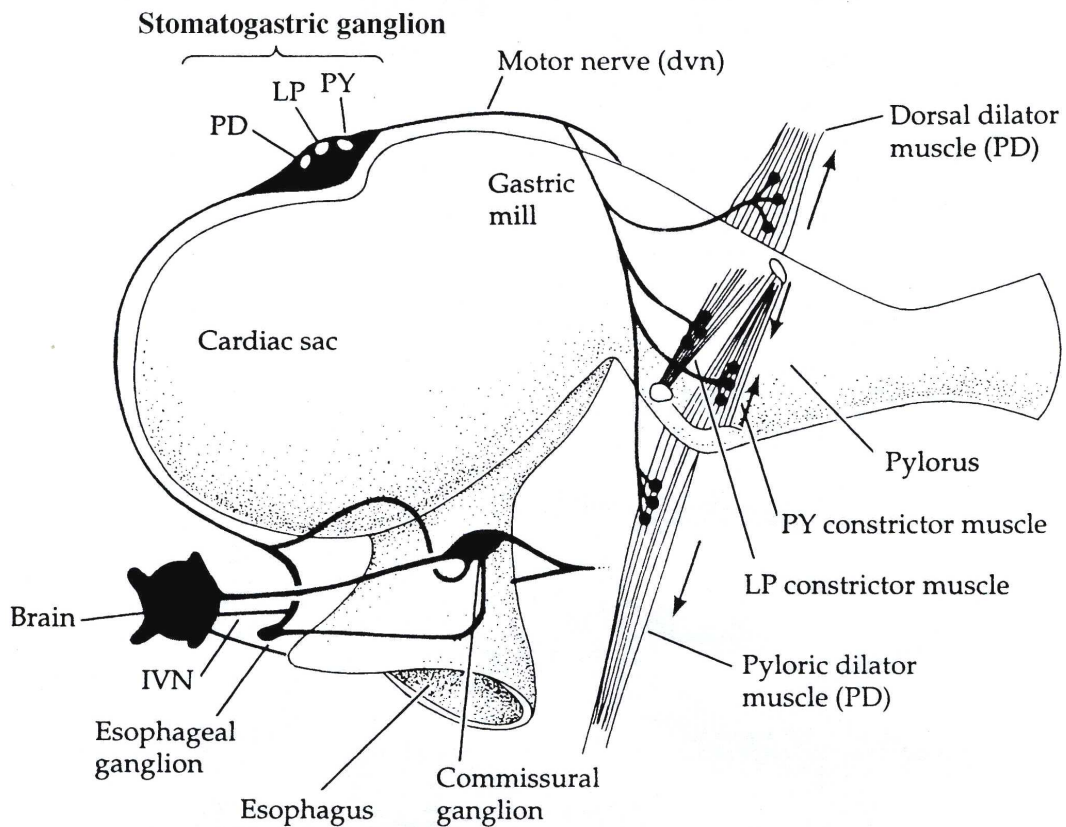


FIGURA 3.2 Vista esquemática do estômago e do sistema nervoso estomogástrico associado, consistindo de dois gânglios comissurais que formam protuberâncias nos conectivos circumesofágicos, um pequeno gânglio esofágico localizado na superfície anterior do esôfago e um gânglio estomogástrico localizado na superfície dorsal do estômago. Cortesia de R. Elson.

Os músculos do estômago são comandados por axônios originados em neurônios motores localizados no STG. Os músculos são pareados bilateralmente, mas os neurônios motores não são, cada neurônio motor controla os dois membros de um par de músculos apropriados; o axônio bifurca-se e conecta-se aos dois músculos componentes do par.

3.1 – Dissecação e Preparação do Gânglio Estomogástrico (STG):

Os siris azuis *Callinectes sapidus* são adquiridos de pescadores em Iguape – SP e mantidos por até dois meses em um aquário com água salobra e sistemas de filtragem e oxigenação da água. Durante este período os animais são alimentados raramente para que gastem suas reservas de energia. Seguindo este procedimento, o

tecido tende a apresentar menos gordura que o normal, facilitando a visualização do sistema nervoso e a dissecação.

O animal é anestesiado por imersão em gelo durante ~30 minutos. Após a anestesia, inicialmente são removidas as garras e as patas. O estômago é exposto com a remoção do exoesqueleto e da pele interior. O estômago é removido cortando-se a artéria oftálmica na região posterior ao estômago e removendo-se todas as conexões do gânglio supraesofágico, exceto as conectivas circumesofágicas. Usando uma pinça curva para segurar a base do esôfago e uma pequena tesoura desconecta-se o esôfago do exoesqueleto. Após levantar o estômago, puxando pelo esôfago e cortando simultaneamente as duas conectivas circumesofágicas, este pode ser removido do animal. As conexões do estômago com o intestino e o hepatopâncreas normalmente quebram quando o estômago é levantado e, portanto, não precisam ser cortadas. Esta primeira fase da preparação leva cerca de 20 minutos.

Após a remoção do estômago este é lavado repetidamente com a solução fisiológica específica do crustáceo, para remover os sucos gástricos que poderiam danificar o sistema nervoso, e aberto na linha média ventral partindo-se da abertura para o intestino até a abertura do esôfago. 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. Antes de fixar o estômago à placa de Petri, cortam-se as pontas dos três dentes que constituem a moela gástrica para tornar o estômago plano. Esta fase da preparação leva aproximadamente 5 minutos. Neste ponto, a preparação consiste no estômago, no gânglio supraesofágico, nas conectivas circumesofágicas e no sistema nervoso estomatogástrico e muscular completo fixado a uma placa de dissecação preenchida com a solução fisiológica do crustáceo, conforme mostrado na Figura 3.3. Nestas condições, geralmente, é possível observar o movimento rítmico do estômago por até uma hora.

Na última fase da dissecação, cada um dos nervos é identificado, observando-se, para tal, qual é músculo a que o nervo é conectado. O nervo é então removido da superfície do músculo, da gordura e do tecido conectivo ao redor até o ponto onde entra na artéria oftálmica. Esta artéria juntamente com todo o sistema nervoso estomatogástrico é transferida para uma placa de Petri revestida com silicone transparente e preenchida com solução fisiológica. Os nervos são fixados à placa de Petri na mesma posição relativa que possuíam no estômago como mostrado na Figura 3.4. Efetua-se então a limpeza do sistema nervoso do tecido conectivo remanescente, gordura ou excesso de tecido das artérias. Corta-se uma janela na parede arterial ao redor do STG para este possa ser iluminado por baixo da placa de Petri. Finalmente as células do STG são expostas, como mostrado na Figura 3.5, removendo-se uma fina camada de tecido conectivo protetor, usando-se pinças e tesouras especiais para microcirurgia. Esta fase final da dissecação pode demorar de 2 a 5 horas, dependendo principalmente da quantidade de gordura encontrada nos tecidos.

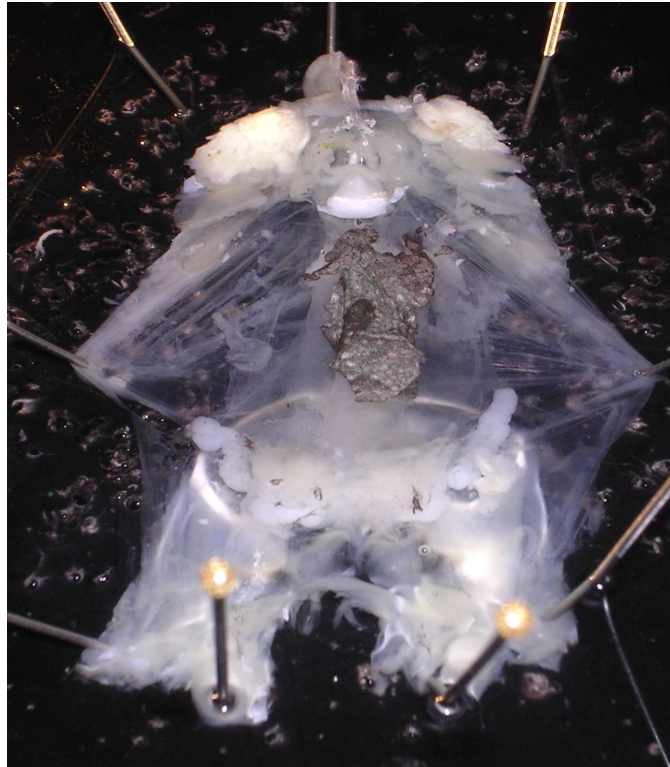


FIGURA 3.3 O estômago aberto do siri, contendo o sistema nervoso estomatogástrico e o cérebro do animal, fixado com pinos de aço-inóx à placa de dissecação onde é mantido imerso em solução fisiológica.

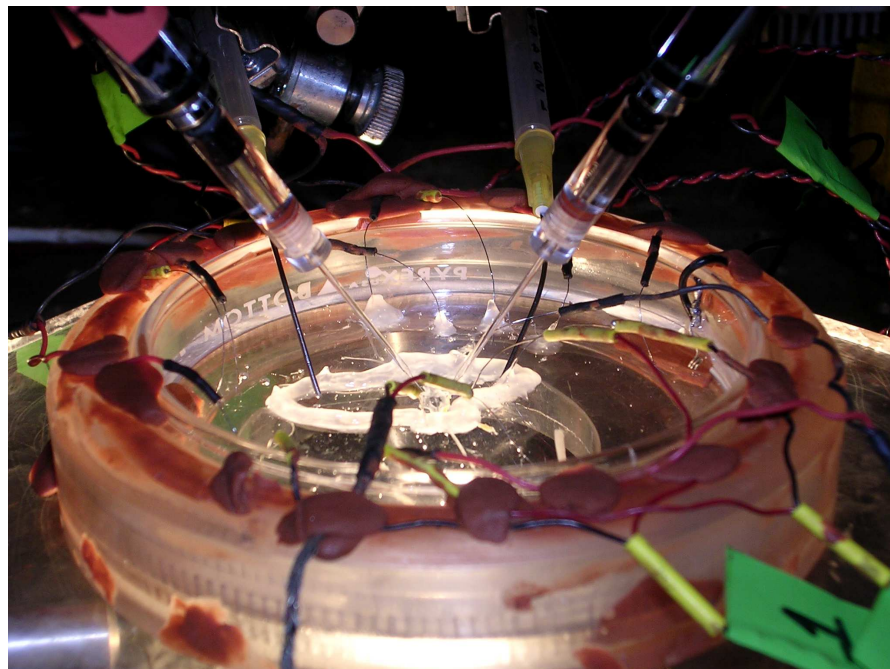


FIGURA 3.4 A preparação na placa de Petri, pronta para medidas da atividade intra e extracelular. Os pontos brancos são ilhas de vaselina usadas para isolar os eletrodos extracelulares da solução salina fisiológica. O STG encontra-se na região entre as pontas dos eletrodos intracelulares.



FIGURA 3.5 O STG como aparece no microscópio de dissecação. Vários corpos celulares e axônios presentes na superfície dorsal do gânglio parcialmente exposto com a remoção do tecido conectivo protetor são claramente visíveis. O nervo principal que entra no gânglio (acima) é o nervo estomatogástrico (SGN) enquanto os principais nervos eferentes são o par de nervos anteriores laterais (ALNs) e abaixo, o nervo dorsal ventricular (DVN).

3.2 – Identificação das células do STG e bloqueio das sinapses

O soma dos neurônios componentes do STG não tem uma posição fixa ou previsível no gânglio, portanto, o primeiro passo após a dissecação é identificar e mapear a posição do corpo celular dos neurônios. Esta identificação é feita comparando-se medidas extra- e intracelulares como descrito a seguir.

Medidas extracelulares da atividade elétrica do STG são obtidas a partir da inserção de pares de fios finos de aço inox no silicone da placa de Petri. O eletrodo que toca o nervo é isolado da solução fisiológica com vaselina e o outro (referência) permanece em contato com a solução. Os sinais assim obtidos, após amplificação diferencial (ganho ~ 10000), podem ser observados em um osciloscópio ou digitalizados e gravados em disco por um computador. Medidas intracelulares são obtidas inserindo-se eletrodos (20-50 $M\Omega$) no corpo celular. Os eletrodos intracelulares são micropipetas de vidro preenchidas com uma solução 3M KCl.

A identidade dos nervos periféricos é conhecida a priori, uma vez que estes nervos foram identificados durante a dissecação, observando-se qual o músculo que era controlado. Um esquema dos nervos que podem ser observados e ter sua atividade elétrica gravada encontra-se na Figura 3.6.

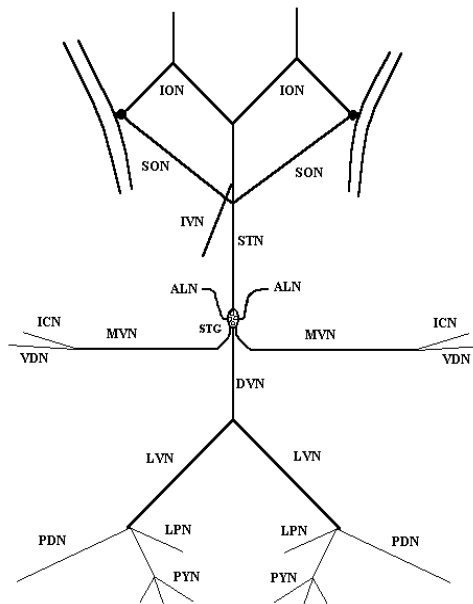


FIGURA 3.6 Esquema do sistema nervoso estomatogástrico após a dissecação. Nomenclatura dos nervos: ION – esofágico inferior, SON – esofágico superior, IVN – ventricular inferior, STN – estomatogástrico, ALN – lateral anterior, MVN – ventricular mediano, DVN – ventricular dorsal, LVN – ventricular lateral, PDN – dilatador pilórico, LPN – pilórico lateral, VDN – dilatador ventricular, ICN – cardíaco inferior, PYN – pilórico.

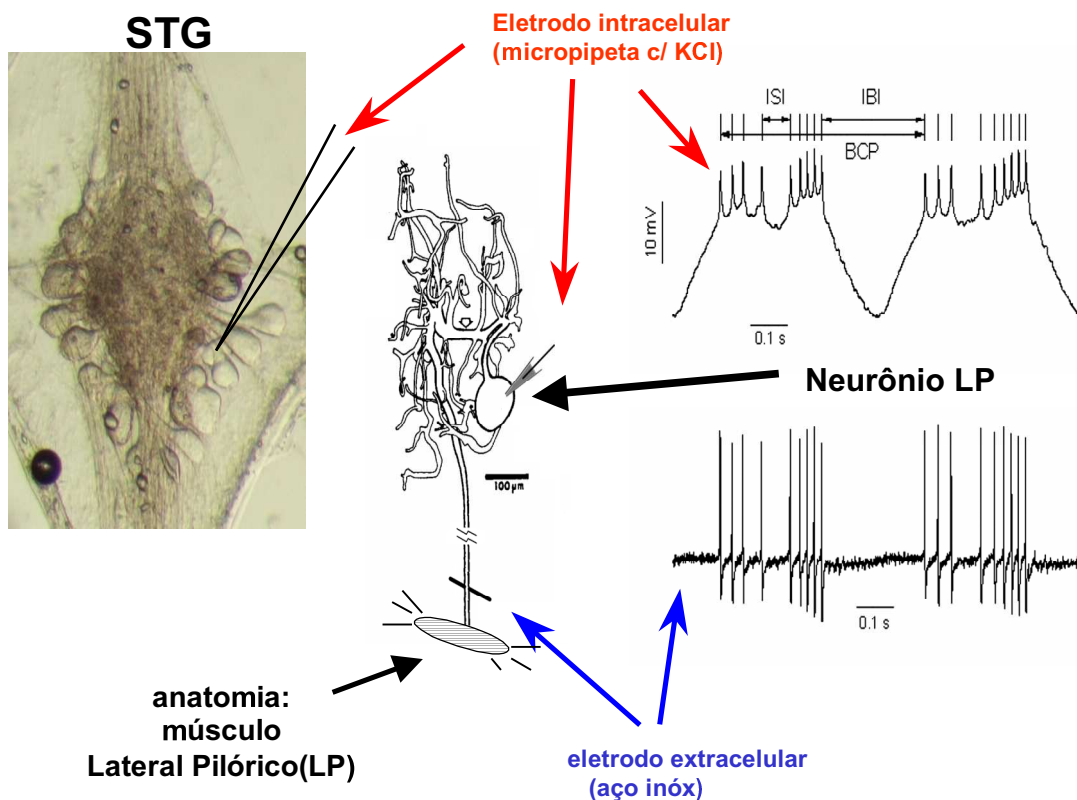


FIGURA 3.7 Identificação dos neurônios comparando medidas intracelulares com medidas extracelulares. O sinal observado no nervo LP é proveniente do neurônio LP. Assim, a sincronização entre os potenciais de ação provenientes do corpo celular e os potenciais de ação em um dos axônios conhecidos estabelece a identidade da célula.

Cada uma das células que exibem atividade espontânea (potenciais de ação) pode ser identificada como o neurônio cujo axônio enerva um músculo particular, ou um neurônio pertencente ao grupo de neurônios que enerva o músculo. Potenciais de ação observados periféricamente que estão sincronizados com os potenciais de ação atenuados medidos no corpo celular estabelecem a localização do axônio conforme descrito na Figura 3.7.

A maioria das células que não exibem atividade espontânea podem ser excitadas quando uma corrente de despolarização é injetada no soma. Entretanto, em alguns experimentos, alguns neurônios são refratários à despolarização de seus somas, mas a maioria destas células são capazes de produzir um trem de potenciais de ação quando liberadas de uma forte hiperpolarização. Neurônios que não exibem atividade nem mesmo nestas condições, não podem ser identificados. Em boas preparações é possível identificar-se normalmente da ordem de 20 células do STG. Um outro método de reforçar a identificação das células é usar a informação sobre as interconexões sinápticas conhecidas. As interações sinápticas entre células identificadas são examinadas observando-se um par de medidas intracelulares enquanto se monitora os outros neurônios extracelularmente. Devido a limitações mecânicas e de espaço no aparato, geralmente apenas duas células são observadas simultaneamente com eletrodos intracelulares. Para testar as interações sinápticas entre duas células injeta-se corrente em uma delas e procura-se por algum efeito (potencial pós-sináptico – PSP) ou mudanças no potencial de membrana da outra célula.

Usando estas técnicas de identificação das células e das interações sinápticas o circuito neural típico responsável pela geração dos padrões de atividade pilórica (CPG pilórico) do STG pôde ser mapeado conforme descrito na Figura 3.8.

Existem quatro tipos de conexões sinápticas entre as células do STG. As sinapses químicas são todas inibidoras e os neurotransmissores utilizados são acetilcolina e glutamato. As sinapses colinérgicas podem ser desativadas adicionando-se tetraetilamônia (TEA) à solução fisiológica (tipicamente ~ 2 mM TEA é suficiente para bloquear as sinapses), enquanto as sinapses glutamatérgicas podem ser bloqueadas com picrotoxina – PTX (tipicamente 10 μ M). As sinapses elétricas, entretanto, não podem ser bloqueadas por agentes farmacológicos. Quando deseja-se bloquear uma sinapse elétrica em uma determinada célula, usa-se um método conhecido como fotoinativação da outra célula (Bal *et al.*, 1988). A fotoinativação é um processo irreversível que consiste em empalar a célula que se deseja eliminar com um microeletrodo preenchido com solução 3M de KCl e uma pequena quantidade do corante fluorescente 5-6 carboxi-fluorescina ou Lúifer-Yellow. Uma pequena corrente negativa (~ -5 nA) é produzida no eletrodo e espera-se cerca de 5 minutos para que o corante seja transferido ao interior do corpo celular e por difusão atinja o axônio e demais partes do neurônio. Após a injeção do corante, o neurônio é iluminado com uma luz azul intensa, esta é absorvida pelo corante que re-emite na região do amarelo/verde. Com a emissão da luz é produzido ozônio que oxida as proteínas no interior da célula, o que acaba por desativá-la após alguns minutos de exposição à luz azul.

Na figura 3.9 é exibido o comportamento elétrico intrínseco de três células do CPG pilórico do STG, assim como os métodos usados para bloquear as sinapses.

Apesar do ritmo produzido pelo CPG pilórico ser perfeitamente periódico, quando as células são isoladas, o único neurônio que continua a apresentar atividade periódica similar à do circuito é o interneurônio AB; as outras células passam a comportar-se de modo irregular.

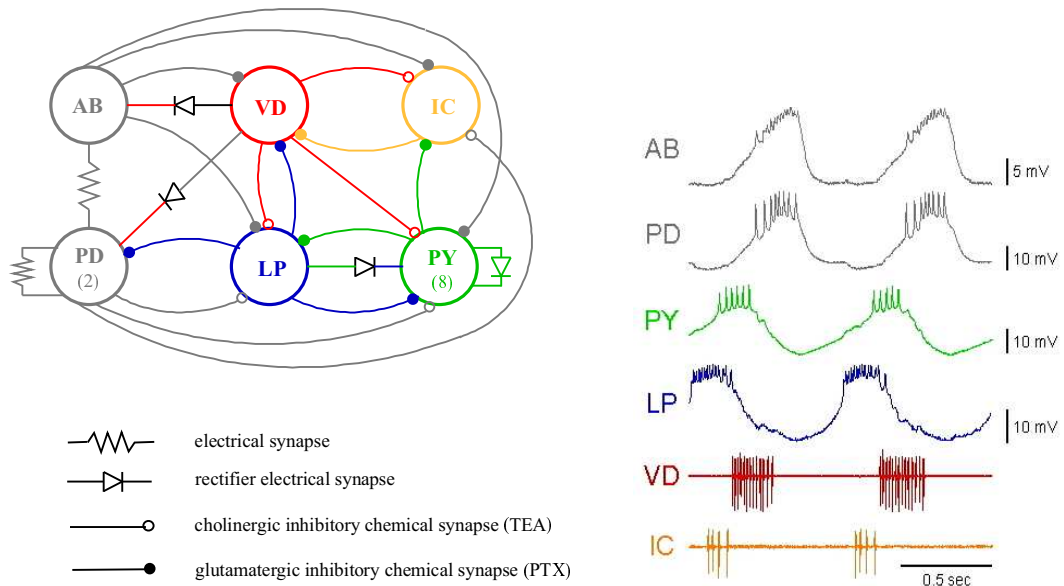


FIGURA 3.8 Esquerda: circuito neural simplificado do CPG pilórico do STG. Neurônios: AB – burster anterior, PD – dilatador pilórico, VD – dilatador ventricular, LP – pilórico lateral, IC – cardíaco inferior, PY - pilórico. Direita: atividade elétrica dos neurônios do CPG pilórico, os dois traços inferiores correspondem a medidas extracelulares.

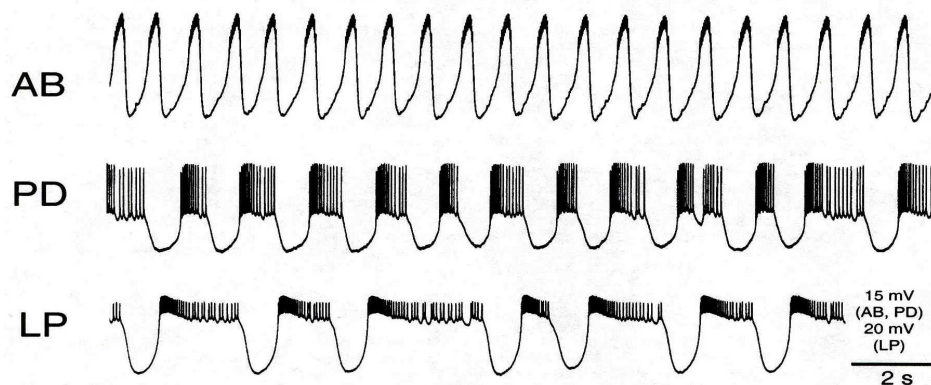


FIGURA 3.9 Atividade elétrica intrínseca de células isoladas do CPG pilórico do STG. Métodos de isolamento: AB : VD e PDs fotoinativados + PTX; PD : AB e VD fotoinativados + PTX; LP : PDs fotoinativados + PTX.

3.3 – Comportamento dinâmico intrínseco de neurônios do STG

O comportamento intrínseco de um neurônio LP do STG pode ser analisado após a aplicação de PTX e a fotoinativação dos dois neurônios PD. Na figura 3.10(1) é mostrada parte de uma longa série temporal do potencial de membrana de um neurônio LP isolado exibindo comportamento irregular. Observa-se que o comportamento inicial dos trens de potenciais de ação (bursts) é bem estereotipado em toda a série, porém a evolução de cada burst ocorre de maneira diferente. Esta característica pode ser facilmente observada quando se superpõe diferentes bursts em

um único gráfico, alinhando-se os bursts pelo primeiro potencial de ação (spike) como feito na Figura 3.10(2). Observa-se que, durante os primeiros spikes, o comportamento é muito similar em todos os bursts, porém após algum tempo, os sinais divergem rapidamente, como acontece em um sistema caótico que possui sensibilidade às condições iniciais.

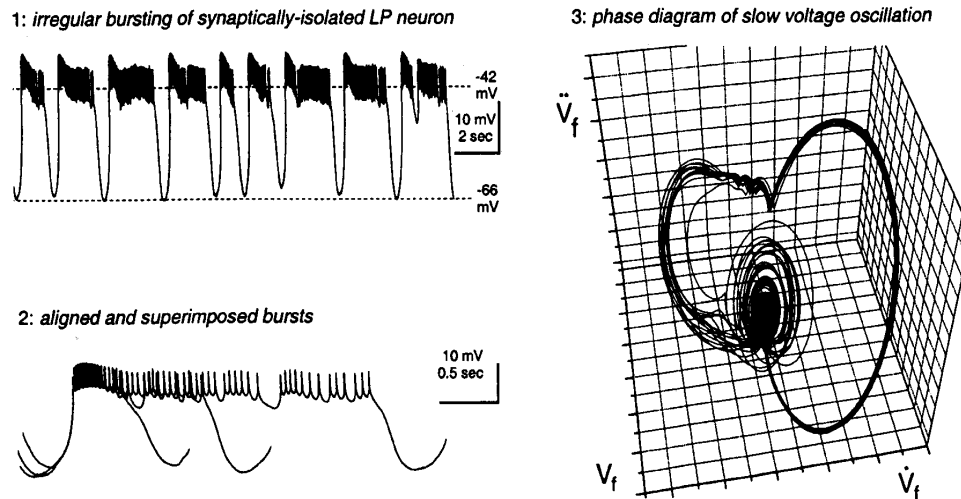


FIGURA 3.10 Bursts irregulares espontâneos de um neurônio LP isolado do STG. (1) Trecho da série temporal do potencial de membrana exibindo o padrão irregular típico dos bursts do LP. (2) Três bursts alinhados usando-se o primeiro spike como referência. (3) Espaço de fase reconstruído a partir das oscilações lentas do potencial de membrana da célula. Um filtro passa-baixas (freq. corte = 5 Hz) foi utilizado para remover os spikes da série temporal. O gráfico de $V(t)$ em função de sua primeira e segunda derivadas mostra além de algum ruído uma estrutura aparentemente determinística. O movimento das órbitas do atrator tem sentido anti-horário. A órbita maior corresponde às hiperpolarizações entre bursts, enquanto a espiral menor corresponde às oscilações mais rápidas que ocorrem no platô durante cada burst. Extraída de Selverston et al. (2001).

As células do STG de invertebrados possuem o soma não-estimulável, os spikes são gerados em uma região no início do processo do qual emerge o axônio, enquanto as oscilações lentas e graduais do potencial de membrana são produzidas em outra região. Experimentos recentes usando uma droga conhecida como QX104 que quando injetada na célula bloqueia os canais de Na e suprime os spikes, mas não afeta as oscilações lentas do potencial de membrana, mostraram que as oscilações lentas independem dos spikes e possuem as mesmas características observadas quando a célula produzia spikes, ou seja, a irregularidade observada não é relacionada com os spikes, e estes podem ser removidos da série temporal (usando filtros) para facilitar a análise dinâmica (Elson, 2001). Aplicando-se um filtro passa-baixas para eliminar os spikes da série temporal do potencial de membrana do neurônio LP obtém-se um espaço de fase reconstruído como o mostrado na Figura 3.10(3). Observa-se que o comportamento da trajetória é cíclico, sendo composto basicamente por dois ciclos. Um ciclo central menor é repetido um número de vezes que varia a cada passagem da órbita pela região e um ciclo maior reinjeta a órbita no ciclo menor quando esta eventualmente escapa. Usando-se apenas a primeira derivada do potencial de membrana filtrado (para eliminar flutuações lentas devido ao drift do microeletrodo e dos amplificadores), reconstruindo o atrator usando um mapa de retorno (projeção bidimensional), observou-se o comportamento do atrator em função do passo de reconstrução. O ciclo maior apresenta dobras que o aproximam do ciclo menor na

projeção bidimensional e a melhor separação entre ciclos foi obtida para um passo de reconstrução de 200 ms (neste caso o ciclo maior tangencia o ciclo menor, mas a maioria dos pontos dos dois ciclos não se misturam). O máximo expoente de Lyapunov calculado para este passo de reconstrução foi $\lambda=1.25/s$, usando o programa LENNS (Ellner, 1992), o que indica tratar-se de um atrator caótico.

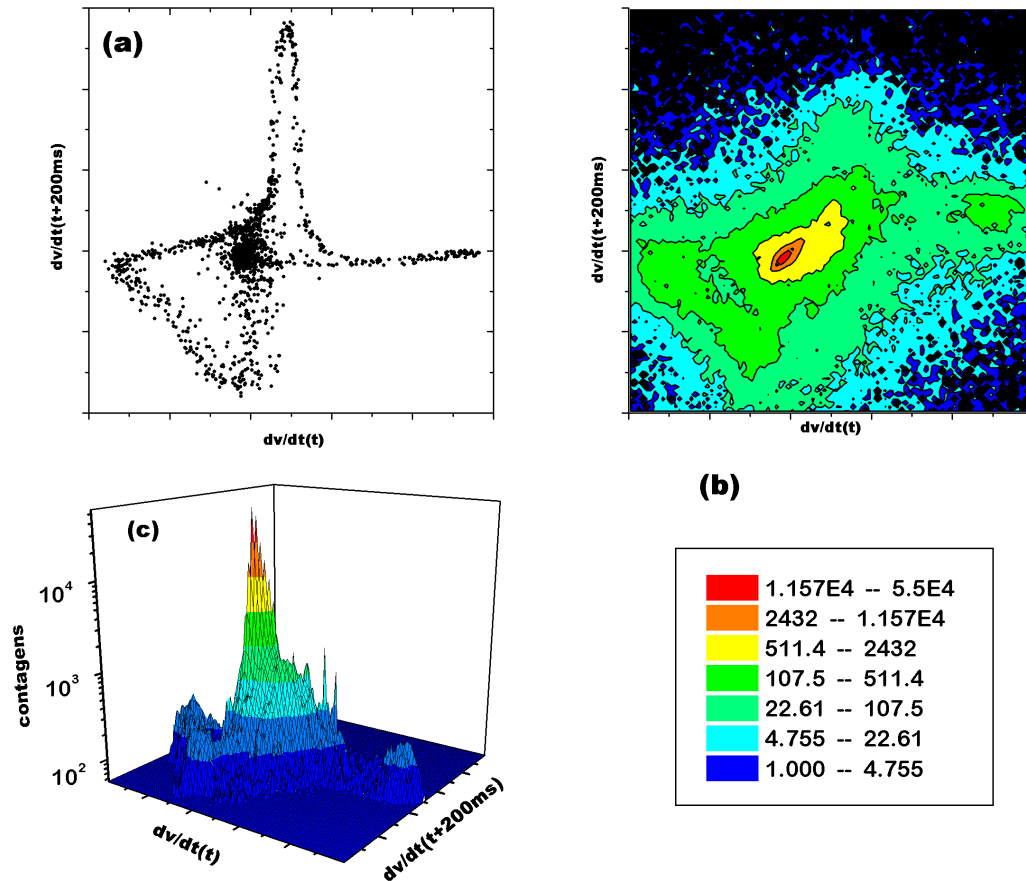


FIGURA 3.11 Resultados da aplicação da Transformada do Ponto Fixo (TPF) à série temporal da derivada da voltagem de membrana de um neurônio LP isolado do CPG. (a) Atrator bidimensional reconstruído. (b) e (c) histogramas obtidos da (TPF). O pico do histograma indica a posição do ponto de sela no atrator.

Como o comportamento do atrator sugere a existência de um ponto fixo no centro do ciclo menor aplicamos um método para encontrar pontos fixos instáveis conhecido como “Transformada do Ponto Fixo” (So et al., 1996, 1997, 1998) para verificar esta hipótese.

Os resultados obtidos são mostrados na Figura 3.11. Observa-se claramente a existência de um ponto fixo instável (sela) no centro do ciclo menor. Com esta informação, baseando-se no comportamento das órbitas do atrator, podemos esboçar o espaço de fase do sistema como feito na Figura 3.12. O comportamento sugere a existência de uma órbita homoclínica e, é bastante similar ao encontrado nas simulações numéricas dos neurônios modelo Hindmarsh-Rose que possuem o ponto de sela na região de comportamento rápido (durante os *bursts* onde os potenciais de

ação são gerados) e a órbita homoclínica (região de hiperpolarização) entre os *bursts* (Abarbanel *et al.*, 1996). Desse modo, a duração de um determinado *burst* é dada pelo número de ciclos que a órbita do atrator permanece próxima ao ponto de sela.

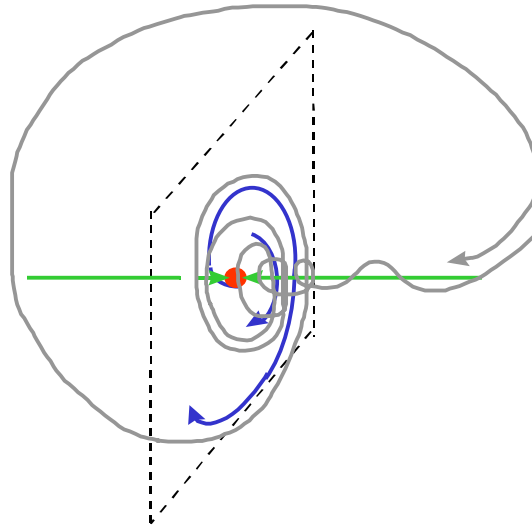


FIGURA 3.12 Esboço do espaço de fase baseado na presença do ponto de sela (vermelho), sua variedade estável (verde) e instável (azul) e no comportamento das órbitas do atrator. Uma órbita hipotética é representada em cinza.

4. Um laboratório de eletrofisiologia no IFUSP

4.1 - A idéia inicial

No final de meu pós-doutoramento no INLS, havia aprendido todas as técnicas de dissecação e preparação do sistema nervoso estomogástrico biológico (descritas no Capítulo 4) e também havia desenvolvido novas técnicas de *dynamic clamp* (Capítulo 6) que permitiam realizar muitos experimentos que até então não eram possíveis. Discuti com o Prof. Allen Selverston, um dos coordenadores de meus trabalhos em San Diego e pioneiro na pesquisa do sistema nervoso de crustáceos, minhas idéias de instalar um equipamento de eletrofisiologia para continuar minhas pesquisas no IFUSP. O Prof. Selverston apoiou a idéia e afirmou que neste caso poderíamos continuar realizando diversos trabalhos em colaboração e intercâmbio de estudantes.

Nesta mesma época, entrei em contato com o Dr. Jocemar Tomasino Mendonça, especialista em crustáceos e coordenador do Projeto Pesca Sul Paulista – Cananéia/SP, que indicou o siri azul *Callinectes sapidus* para os experimentos no Brasil, uma vez que é barato (~R\$ 2,00/siri), existe em abundância no litoral sul paulista e não é sujeito a proibições de pesca sazonais como acontece com as lagostas espinhosas *Panulirus interruptus* que usávamos em San Diego. Para verificar a viabilidade dos experimentos, ainda em San Diego, obtive alguns destes animais provenientes da Flórida (Gulf Specimen Marine Laboratories, Inc.). Observamos que este crustáceo possuía um sistema nervoso estomogástrico semelhante ao da lagosta com que trabalhávamos, apenas possuindo estômago menor, e requerendo maior cuidado durante a dissecação.

Antes de meu retorno ao Brasil, com o apoio do Prof. Sartorelli, coordenador do LFNL, tive um projeto de pós-doutoramento aprovado para trabalhar no LFNL com as novas técnicas aprendidas em neurônios eletrônicos e junto com minha mudança trouxe a doação do Prof. Selverston de vários equipamentos usados, mas em boas condições, para iniciar a montagem um pequeno laboratório de eletrofisiologia. Entre os equipamentos doados pelo Prof. Selverston estavam: uma balança analítica, uma placa de aquisição de dados Digidata 1200, um puxador de micropipetas, um microscópio de dissecação, um osciloscópio analógico, dois micromanipuladores Narishige, um amplificador intracelular de fabricação caseira. Estes equipamentos, mesmo não sendo suficientes para realizar um experimento completo com os neurônios biológicos permitiram que treinássemos as técnicas de dissecação e que realizássemos experimentos com neurônios eletrônicos.

O restante do equipamento de eletrofisiologia necessário foi comprado após minha contratação como docente pelo IFUSP, com recursos de um aditivo ao projeto temático FAPESP “Dinâmica Não-Linear” do qual o LFNL fazia parte.

4.2 - Um aparato para o estudo de neurônios eletrônicos

Com meu regresso ao Brasil, o início de minha bolsa FAPESP de pós-doutoramento no LFNL em junho/2001, e o apoio do coordenador do LFNL, iniciei a montagem de um aparato experimental para o estudo de redes neurais artificiais. Para isso foi adaptado um programa de *dynamic clamp* (Capítulo 6) para funcionar em um microcomputador IBM-PC compatível (Pentium III 1.1GHz) do LFNL com a placa de

aquisição de dados Digidata 1200 doada pelo INLS. Para os primeiros testes, utilizamos dois neurônios eletrônicos (ENs). A montagem experimental é mostrada na Figura 4.1.



Figura 4.1: O primeiro aparato experimental: neurônios-modelo eletrônicos conectados ao programa Dynamic Clamp e a monitoração do comportamento dinâmico em um osciloscópio simulado em outro computador.

O desempenho do *dynamic clamp* foi superior ao esperado, atingindo uma taxa de atualização da corrente (para 2 canais) de 22 kHz. Atualmente, para permitir a utilização de placas ADC/DAC comerciais e não apenas a placa Digidata da Axon Instruments (para a qual foi escrito o software atual), estamos desenvolvendo um programa de *dynamic clamp* para o sistema operacional Linux e um circuito eletrônico que vai demultiplexar as 2 saídas analógicas da placa DAC para permitir a conexão entre até 8 células (eletrônicas ou biológicas), uma vez que uma frequência de atualização de 5 kHz é mais do que suficiente tanto para ENs quanto para as células biológicas de crustáceos com que trabalhamos.

4.3 - O biotério

O primeiro biotério para manter os crustáceos que eram utilizados nas dissecações foi montado em uma pequena edícula (1,5m x 1,2m) na parte exterior do edifício ALA I do IFUSP, onde com recursos do projeto temático FAPESP do LFNL instalamos uma estante com quatro prateleiras nas quais foram montados 8 tanques com 70 litros de água salobra (35 l água doce + 35 litros água do mar). Foi instalada uma caixa d'água de 300 l sob o telhado da edícula e um sistema de bombeamento que permite abastecer a caixa d'água com água trazida do litoral de Santos em

tambores de 50 litros cada, permitindo manter uma grande quantidade de água salgada eventualmente necessária para alguma troca de água.

Cada um dos tanques (Figura 4.2) possuía um filtro de água com carvão ativado com uma vazão de 360 litros por hora, permitindo manter a água nas condições adequadas para a manutenção de até 3 siris *Callinectes sapidus* por tanque. A água que cai do filtro de volta ao tanque oxigenava a água e o carvão ativado eliminava substâncias que podiam tornar-se tóxicas aos animais. Dessa maneira podíamos manter até 24 animais experimentais, quantidade suficiente para realizar experimentos por mais de um mês.



Figura 4.2: Detalhe de uma das prateleiras do primeiro biotério onde os animais eram mantidos até o momento da dissecação.

Apesar dos cuidados com a filtração e oxigenação da água, a mortalidade de animais neste primeiro biotério era bastante elevada. Os animais são muito agressivos e de hábitos canibalistas. Como devem ficar sem alimentação por um longo período para facilitar a dissecação acabam atacando os companheiros de tanque e contaminando a água, que devido ao pequeno volume, estagnava rapidamente durante a noite (especialmente em dias quentes) causando a morte de todos os habitantes do tanque.

Este problema foi resolvido com a montagem de um novo biotério em uma caixa d'água de 1000 litros de capacidade, mostrada na Figura 4.3, instalada no interior do prédio da ALA I, onde fica protegida do calor externo. A água salobra é obtida utilizando-se sal para aquário (Red Sea) e água filtrada. Para manter a qualidade da água instalamos 4 filtros d'água submersos e uma bomba de ar. Os animais são separados em 8 caixas plásticas vazadas imersas dentro da água. Colocando-se um máximo de 4 animais em cada caixa, chega-se ao máximo de 32 animais, suficientes para mais de um mês de experimentos.



Figura 4.3: O biotério atual: os siris são mantidos separados em grupos de no máximo 4 animais em compartimentos plásticos imersos numa caixa com 1000 litros de água salobra onde 4 filtros submersos e uma bomba de ar fazem a manutenção da qualidade da água.

4.4 - O aparato atual

Em maio de 2001 me inscrevi em dois processos seletivos para a contratação de professores no departamento de Física Geral do IFUSP: um deles direcionado para todas as áreas experimentais do departamento e outro para a área de biofísica experimental. Como o relatório anual do Projeto Temático do qual o LFNL fazia parte era devido em julho de 2001, aproveitei para submeter meu projeto de pesquisa em redes neurais juntamente com o relatório e com um pedido de aditivo para completar o aparato experimental de eletrofisiologia e ampliar a proposta original do Projeto Temático para estudar redes neurais biológicas. Em outubro de 2001 obtivemos a resposta da FAPESP que apesar de positiva em favor do aditivo teve os recursos condicionados à minha aprovação em um dos processos seletivos. Em novembro de 2001 fui aprovado no processo seletivo para todas as áreas experimentais do departamento e no início de 2002 começamos o processo de importação dos equipamentos. A montagem do laboratório atual teve início no final de 2002.

Os equipamentos financiados pela FAPESP através do Projeto Temático “Dinâmica Não-Linear” são listados abaixo:

2 Microscópios estereoscópicos com encaixe para câmara: Um dos microscópios foi fixado a uma mesa comum (figura 4.4) e é utilizado nas várias etapas do processo de dissecação e preparação do gânglio estomatogástrico dos siris *Callinectes sapidus*, desde a abertura do animal e retirada do estômago até a exposição do corpo celular dos neurônios. O outro microscópio foi fixado a uma mesa óptica anti-vibração e utilizado para inserir eletrodos nas células para realizar a identificação dos neurônios e a realização de experimentos usando *dynamic clamp* e/ou outras técnicas (figura

4.5). Precisamos de dois microscópios porque a preparação é um processo demorado (~4 horas) e, em experimentos em que serão usados gânglios de mais de um animal, podemos iniciar a identificação das células de um gânglio enquanto outra pessoa inicia a dissecação de um segundo gânglio.

1 Câmara digital para microscópio: A câmara digital é utilizada para a documentação dos experimentos e para a gravação/exibição da dissecação ou da introdução dos eletrodos nas células como um recurso didático (o equivalente seria adquirir um microscópio didático de custo bastante superior, grandes dimensões e que não permite a documentação). A câmara é utilizada em ambos os microscópios.

4 Amplificadores intracelulares A-M Systems modelo 1600: Experimentos usando a técnica de *dynamic clamp* necessitam que uma mesma célula seja penetrada com dois eletrodos, um apenas para medir o potencial de membrana e um apenas para a injeção de corrente, assim como pretendemos conectar no mínimo 2 células biológicas, precisamos de 4 amplificadores intracelulares.

1 Amplificador extracelular A-M Systems modelo 1700: Este amplificador usado para medir o sinal que chega aos nervos identificados e permitir a comparação com as medidas intracelulares para a identificação das células.

1 Mesa óptica anti-vibração Newport modelo LW3036B-OPT-02: Esta mesa pneumática é utilizada com o microscópio e micromanipuladores para a inserção de microeletrodos nas células biológicas. Quando insere-se um eletrodo em uma célula qualquer vibração do micromanipulador pode provocar danos na membrana celular inutilizando a preparação, esta mesa além de minimizar movimentos relativos entre o microeletrodo e a célula também reduz a transmissão de vibrações mecânicas à preparação, permitindo a realização de experimentos por várias horas.

1 Placa de Aquisição de dados (ADC/DAC) National PCI-MIO-16E1: Esta placa está sendo aplicada no projeto de implementação do protocolo *dynamic clamp* em sistema operacional Linux e com placa ADC/DAC comercial.

1 Amplificador Voltage Clamp AxoClamp 2B: Além de funcionar como um excelente amplificador intracelular com dois canais, este amplificador pode ser usado na função voltage clamp para forçar uma célula biológica a apresentar um padrão elétrico pré-estabelecido (em experimentos de *pattern clamp*) e no futuro será usado para verificar se conseguimos fazer com que uma sinapse biológica seja intensificada ou deprimida quando usamos algoritmos de aprendizado sináptico e padrões temporais gerados por computador.

1 Sistema de aquisição de dados Digidata 1322A (placa ADC/DAC Digidata): Este sistema é usado para gravar os sinais intra e extra-celulares durante os experimentos, além dos sinais gerados artificialmente por computador e as correntes produzidas durante o funcionamento do *dynamic clamp*.

4 Micromanipuladores Narishige modelo MWS-1A: Este manipuladores hidráulicos são usados para posicionar cuidadosamente, e sem vibrações mecânicas, os microeletrodos que são inseridos nas células biológicas. Precisamos de 4 deles para

permitir um perfeito dynamic clamp entre duas células com a inserção de dois eletrodos em cada uma, conforme descrito anteriormente.

1 Refrigerador c/ freezer, 2 portas: É utilizado para armazenar os reagentes químicos, toxinas, solução fisiológica e outros materiais que necessitam de congelamento ou refrigeração.

Além desses itens também foram aprovados 3 computadores para o controle de experimentos, aquisição e análise de dados, instrumentos cirúrgicos para a dissecação e diversos acessórios para eletrofisiologia como: adaptadores para conectar microeletrodos (micropipetas) ao pré-amplificador (head-stage) dos amplificadores intracelulares, eletrodos de prata e de platina, fios de aço inox para construir eletrodos extracelulares e também materiais de consumo como neurotoxinas, neuromoduladores e produtos químicos para produzir a solução fisiológica do siri.

A montagem e instalação do aparato experimental de eletrofisiologia neural foi feita em uma sala de $\sim 9\text{m}^2$ com ar-condicionado, dentro do laboratório principal do LFNL. Diversos estudantes de iniciação científica, mestrado e doutoramento foram envolvidos nas atividades de montagem do laboratório e desenvolvimento de equipamentos, colaborando dessa forma para sua formação experimental.

Os amplificadores e outros módulos eletrônicos usados nos experimentos foram montados em um rack posicionado entre a mesa pneumática e os computadores de controle dos experimentos e aquisição de dados, conforme mostrado na figura 4.6.



Figura 4.4: Mesa de dissecação. Após a retirada do estômago do siri um microscópio estereoscópico com ganho óptico máximo de 100X é usado para observar o sistema nervoso estomatogástrico durante sua limpeza e remoção do estômago e durante a microcirurgia que expõe os corpos celulares do STG.

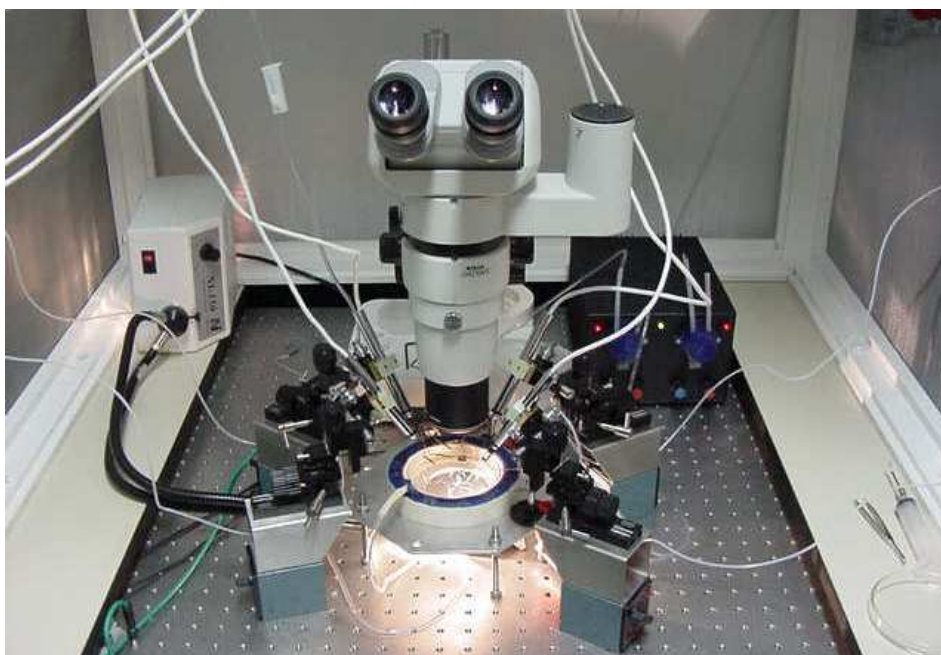


Figura 4.5: A mesa pneumática onde os experimentos são realizados. Um microscópio de ganho 200X é usado para monitorar a empalcação dos neurônios usando até 4 microeletrodos posicionados com micromanipuladores hidráulicos (ao redor da placa de petri). A iluminação é feita por baixo da preparação.



Figura 4.6: Aparato experimental de eletrofisiologia do LFNL. Ao lado direito da foto temos a mesa pneumática onde a preparação biológica é mantida para a inserção de eletrodos nos neurônios. À direita temos os dois computadores necessários para o controle dos experimentos e aquisição de dados e ao centro encontra-se o rack onde os módulos de aquisição de dados e os vários amplificadores intra e extracelulares são montados.

Além dos equipamentos adquiridos, desenvolvemos com tecnologia própria vários outros equipamentos necessários para os experimentos.

Projetamos e construímos adaptadores em aço-inóx para prender os micromanipuladores a fixadores magnéticos usados sobre a mesa pneumática, construímos os eletrodos extracelulares a partir de fios de aço-inóx, montamos uma mesa de alumínio com altura ajustável que, presa a mesa pneumática, serve de suporte para a placa de Petri com a preparação biológica. Depositamos em várias placas de Petri uma camada de elastômero de silicone para fixar os pinos que prendem a preparação biológica. Montamos uma estrutura de madeira ao redor da mesa pneumática onde uma tela de metal foi aterrada para ajudar a minimizar a interferência de ondas eletromagnéticas captadas pelos eletrodos. Tivemos que testar várias configurações diferentes da topologia das conexões e da posição física dos amplificadores e computadores até encontrar a configuração em que o ruído eletrônico é o mínimo possível e a relação sinal/ruído permite obter dados com boa qualidade.

Também construímos um controle eletrônico para bombas peristálticas que permite estabelecer um pequeno fluxo contínuo (perfusão) de solução fisiológica pela preparação biológica para mantê-la sadia, um monitor de áudio baseado em um circuito eletrônico amplificador que permite ao experimentador perceber o que ocorre ao ritmo do circuito neural quando as células são empaladas, sem a necessidade de tirar os olhos do microscópio.

Implementamos a técnica de fotoinativação de células desenvolvendo uma fonte de luz azul de estado sólido, baseada em um LED azul de alta potência. De acordo com a técnica convencional utiliza-se uma lâmpada incandescente de grande dimensão e alta intensidade, como uma lâmpada de vapor de mercúrio, e um sistema de filtros e lentes para produzir a luz azul que atinge a região onde se encontra o gânglio. Este sistema é bastante incômodo porque geralmente a lâmpada, além de ser uma fonte de ruído elétrico, dissipa muito calor e deve ficar próxima à preparação que tentamos manter a uma temperatura de menos de 20 °C.

Nossa fonte de luz (figura 4.7) consiste em um LED azul de alta potência alimentado por 4 pilhas médias, um resistor em série para limitar a corrente máxima e uma lente convergente. O LED e a lente convergente retirada de um ponteiro laser foram adaptados ao interior do corpo de uma caneta esferográfica presa a um micromanipulador. Assim, conseguimos eliminar o ruído elétrico das fontes convencionais e obter uma fonte bastante pequena e que não produz calor. Como podemos focalizar a luz azul em uma região de 1 mm de diâmetro (figura 4.8), podemos desativar apenas uma parte da célula. Assim, podemos desativar um segmento do axônio, não permitindo que os potenciais de ação se propaguem para os músculos ou outros gânglios sem que o funcionamento da célula e suas outras sinapses sejam alterados.

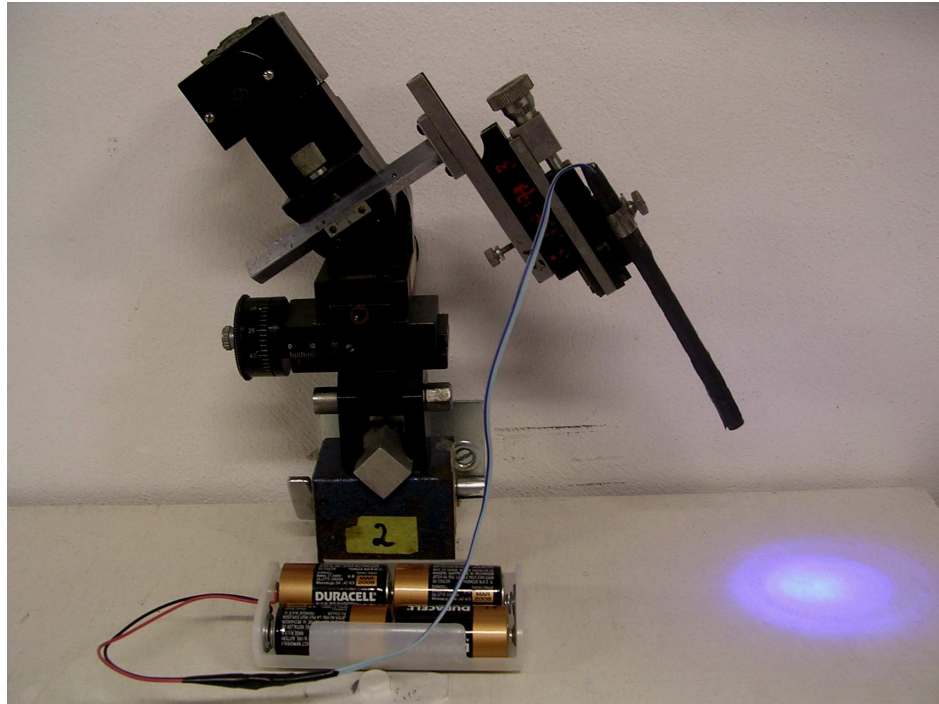


Figura 4.7 : Equipamento desenvolvido no LFNL para a fotoinativação de neurônios. Um led azul de alta potência e uma lente obtida de um ponteiro laser usado foram adaptados ao corpo de uma caneta esferográfica presa a um micromanipulador manual. A lente permite focalizar toda a intensidade da luz do led em uma área de 2 mm^2 a uma distância de 1 cm da ponta da caneta.

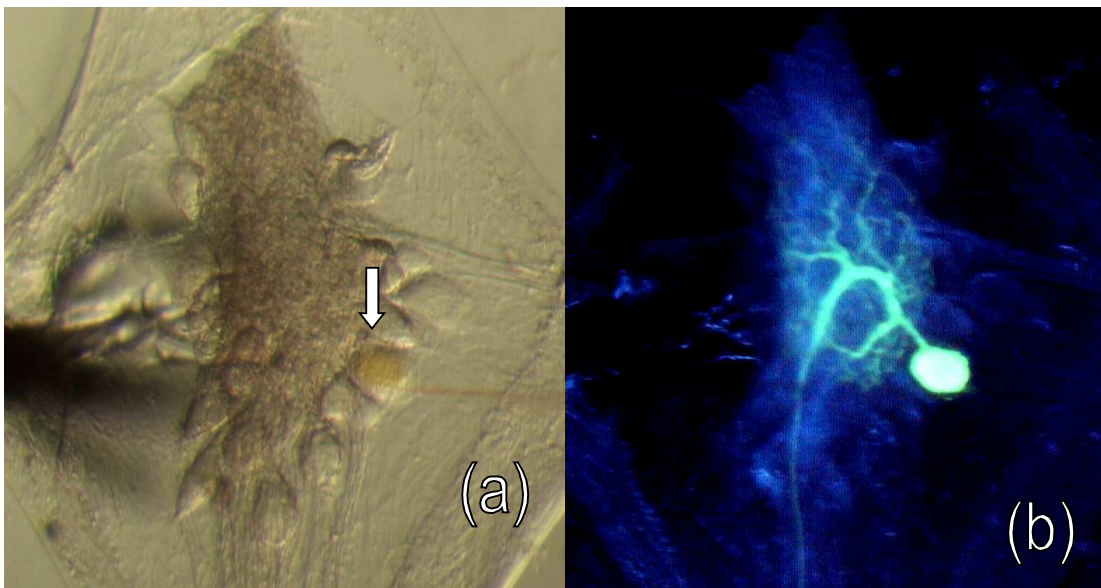


Figura 4.8 : Exemplo de fotoinativação. (a) A seta indica o corpo celular do neurônio em que foi injetado o corante fluorescente. (b) Após a injeção do corante a célula é iluminada com luz azul de alta intensidade e pode-se observar a fluorescência emitida pela árvore dendrítica e pelo axônio que se projeta para baixo da figura.

5. Produção de sinapses artificiais em tecido vivo

5.1 - O protocolo “dynamic clamp”

Um dos métodos mais tradicionais de alterar a atividade elétrica de um neurônio ou perturbar o padrão de atividade de uma rede neural biológica é injetar uma corrente contínua no neurônio usando o método conhecido como *current clamp* em que um circuito eletrônico funciona como uma fonte de corrente pra o neurônio. Este método tanto permite hiperpolarizar como excitar um neurônio. As principais ferramentas usadas para investigar as características de uma particular condutância em um neurônio são os métodos conhecidos como *voltage-clamp* e *patch-clamp* em que um circuito eletrônico fixa a voltagem da membrana celular. Embora essenciais para a compreensão das propriedades elétricas e temporais de uma determinada condutância, estes métodos tem pouca utilidade para estudar o comportamento coletivo de todas as condutâncias que determinam como um neurônio se comporta individualmente ou em um circuito.

A maioria dos experimentos que utilizam *voltage* ou *patch-clamp* fixam ou limitam os valores de voltagem que a membrana do neurônio em estudo pode apresentar e, normalmente, agentes farmacológicos são utilizados para isolar um único tipo de condutância. Desse modo, estes métodos clássicos não permitem, durante a operação normal do neurônio, estudar as alterações das condutâncias da membrana da célula devido às suas propriedades elétricas intrínsecas ou em resposta aos sinais recebidos pelas sinapses com outros neurônios.

O método conhecido como *Dynamic Clamp* consiste em utilizar um computador para introduzir condutâncias artificiais em um neurônio biológico (Sharp et al., 1993). O modo como estas condutâncias dependem da voltagem da membrana ou do tempo é especificado por equações diferenciais que são resolvidas em tempo real por um computador conectado ao neurônio biológico. De um certo modo, o *dynamic clamp* utiliza os neurônios como simuladores, permitindo investigar a importância de um tipo de condutância para a atividade elétrica de um neurônio, assim como determinar o efeito produzido pelas sinapses em uma rede, combinando o controle e flexibilidade de uma simulação no computador com a acurácia e o realismo de um experimento em eletrofisiologia.

Para simular a presença de condutâncias na membrana de um neurônio ou a existência de uma sinapse entre dois neurônios, é implementado um ciclo onde:

- a) a voltagem de membrana dos neurônios é medida através de microeletrodos, amplificada adequadamente, digitalizada por uma placa ADC e lida pelo computador;
- b) baseando-se nas voltagens de membrana, o computador simula em tempo real as equações matemáticas que descrevem as condutâncias e sinapses, calculando as correntes a serem injetadas nos neurônios devido à composição de todas as condutâncias artificiais que estão sendo geradas;
- c) através de um DAC são produzidas tensões de saída proporcionais às correntes a serem injetadas nos neurônios através de microeletrodos (após tratamento adequado nos amplificadores).

Esse ciclo é repetido durante todo o processo e, assim, as condutâncias vão sendo alteradas dinamicamente de acordo com o valor da voltagem de membrana do

próprio neurônio ou com o sinal vindo de um outro neurônio (sinapse artificial). Desse modo, o *dynamic clamp* produz o efeito elétrico das condutâncias e sinapses artificiais como se todas elas estivessem localizadas na ponta do microeletrodo de corrente.

O único *software* comercial de *dynamic clamp* que existia até o início de meu pós doutoramento no INLS foi produzido pelos autores da idéia em 1993 e possuía muitas limitações. O DClamp é um programa MS-DOS escrito para ser rodado em computadores 486 e não funciona em microcomputadores equipados com microprocessador Pentium ou mais moderno. O programa só era capaz de manipular 2 neurônios e a frequência máxima com que o sinal de corrente era atualizado (5 kHz) diminuía drasticamente, devido à baixa velocidade de um 486, para 1 kHz quando 8 condutâncias são simuladas simultaneamente. Esse programa permitia simular duas sinapses químicas, uma sinapse elétrica convencional e condutâncias do tipo ativação-desativação. A alteração dos parâmetros das equações que estão sendo simuladas durante o experimento é um pouco difícil neste programa, sendo necessário sair do ambiente de simulação e reprogramar os parâmetros em outra janela do programa.

Como a maioria dos experimentos que pretendia realizar não poderiam ser feitos com o *dynamic clamp* antigo, a primeira atividade a que me dediquei durante meu pós-doutoramento no INLS foi o desenvolvimento de uma nova versão de *dynamic clamp* que usa um único computador IBM-PC compatível e interface com 2 saídas analógicas para implementar o controle tipo *dynamic clamp* em até 4 células com o auxílio de um circuito demultiplex analógico. Um programa escrito em linguagem C++ implementa todos os procedimentos em um ambiente Windows e permite ao usuário mudar os parâmetros das conexões enquanto o programa está rodando. Para obter a máxima eficiência do programa as rotinas de *dynamic clamp* foram implementadas de modo assíncrono. O programa simula até 8 condutâncias do tipo Hodgkin-Huxley, 18 sinapses químicas ou elétricas em até 4 neurônios e roda com uma frequência mínima de atualização da corrente de saída de 5 kHz em um Pentium III 450 MHz (maior velocidade pode ser obtida usando-se uma versão do programa para apenas duas células).

O trabalho onde detalhamos a implementação de nossa versão do *dynamic clamp* foi publicado no periódico *J. Neuroscience Methods* (Pinto *et al.*, 2001b, *ANEXO 23*). O programa de *dynamic clamp*, incluindo as fontes em C++ e esquemas elétricos do demultiplex analógico, pode ser obtido via internet nos sites <http://inls.ucsd.edu/~rpinto> e <http://fge.if.usp.br/~reynaldo>.

5.2 - Modelos da corrente sináptica e integração em tempo real

A implementação de uma sinapse elétrica no *dynamic clamp* é bastante simples. O computador apenas necessita calcular a diferença entre os potenciais de membrana das duas células e multiplicar este valor pela condutância da sinapse para obter a intensidade da corrente a ser injetada nas células de acordo com as equações

$$\begin{aligned} I_2 &= g_E \cdot (V_1 - V_2) \\ I_1 &= -I_2 \end{aligned} \quad , \quad (5.1)$$

onde g_E é a condutância da sinapse e V_1 , V_2 são os potenciais de membrana das células.

Quando uma sinápsse elétrica é configurada como retificadora, o cálculo da corrente é o mesmo, porém o computador verifica se o potencial de membrana da célula definida como positiva é maior que o potencial de membrana da célula negativa, caso contrário nenhuma corrente é injetada nos neurônios.

O modelo utilizado para calcular a corrente a ser injetada em um neurônio (célula pós-sináptica) nas sinápses químicas é baseado em equações que descrevem uma cinética da liberação de neurotransmissor de primeira ordem (Destexhe et al., 1994)

$$\begin{aligned} I_{sin} &= g_{sin} \cdot S \cdot h \cdot (V_{sin} - V_{pos}) \\ 1 - S_{\infty} \tau_s \frac{dS}{dt} &= S_{\infty} - S, \\ \tau_h V \frac{dh}{dt} &= h_{\infty} V - h \end{aligned} \quad (5.2)$$

onde

$$S_{\infty} (V_{pre}) = \begin{cases} tgh \left(\frac{V_{pre} - V_{tr}}{V_{inc}} \right) & \text{se } V_{pre} > V_{tr}, \\ 0 & \text{caso contrario} \end{cases} \quad (5.3)$$

$$h_{\infty} = \frac{a_h}{1 + \exp\left(\frac{V - V_{trh}}{V_{inch}}\right)}, \quad (5.4)$$

$$\tau_h = \tau_{0h} - \frac{a_{\tau h}}{1 + \exp\left(\frac{V - V_{tr\tau h}}{V_{inc\tau h}}\right)}, \quad (5.5)$$

g_{sin} é a máxima condutância sináptica, S a ativação instantânea, S_{∞} a ativação final, h é a desativação instantânea, h_{∞} é a desativação final e τ_h é o tempo característico de desativação, V_{sin} é o potencial reverso da sinápsse, V_{pre} e V_{pos} são as voltagens de membrana das células pré e pós-sináptica, respectivamente, τ_s é a constante de tempo da sinápsse, V_{th} é o potencial de limiar de ativação e V_{inc} é o potencial que define a inclinação da curva de ativação para S_{∞} e $a_{\tau h}$, τ_{0h} , V_{trh} e $V_{inc\tau h}$ são os parâmetros que definem as características da inativação da sinapse.

Integrando-se algebricamente a equação diferencial para S em (5.2) obtemos

$$S(t) = S_{\infty} + C \exp\left(-\frac{t}{S_{\infty} - 1 \tau_s}\right), \quad (5.6)$$

onde C é uma constante de normalização que fica definida quando ajustamos $S(t)$ às condições iniciais conforme descrevemos abaixo.

A cada ciclo de *dynamic clamp* os valores obtidos para a voltagem de membrana dos neurônios produzem um valor de S_{∞} . Supondo que o ciclo é repetido após um intervalo de tempo Δt (que pode ser medido com precisão de 250ns acessando-se o relógio da placa de aquisição), podemos calcular como a ativação

instantânea da sinápsis descrita por (5.4) teria evoluído após este intervalo de tempo, ou seja, determinamos a constante C através de

$$S_{ant} = S(0) = S_{\infty ant} + C \exp(0) \Rightarrow C = |S_{ant} - S_{\infty ant}|, \quad (5.7)$$

onde S_{ant} é a ativação instantânea no instante prévio e $S_{\infty ant}$ é o valor da ativação final no instante prévio. A ativação instantânea em Δt é, então, dada por

$$S(\Delta t) = S_{\infty ant} + |S_{ant} - S_{\infty ant}| \exp\left(-\frac{\Delta t}{S_{\infty ant} - 1 \tau_s}\right). \quad (5.8)$$

Assim, $S(t)$ segue S_{∞} de modo exponencial com constante de tempo efetiva $(S_{\infty} - 1) \tau_s$. De maneira análoga obtêm-se expressões equivalentes para $h(t)$.

Com esses valores discretos da ativação instantânea, obtidos a cada ciclo de *dynamic clamp* calculamos a corrente a ser injetada no neurônio de acordo com (5.2). Como o ciclo é repetido a uma frequência relativamente alta ($\sim 5\text{kHz}$), a corrente injetada no neurônio tem uma forma suave e contínua.

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_{∞} cresce rapidamente. A função $S(t)$ tende à S_{∞} com constante de tempo efetiva $\tau_{ef} = |1 - S_{\infty}(V_{pre})| \tau_s$.

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

A constante V_{inc} determina quão rápido a função S_{∞} cresce com o potencial de membrana. A constante V_{tr} determina qual é o potencial de membrana no qual a célula pré-sináptica inicia a liberação de neurotransmissores na fenda sináptica. Através de V_{tr} , 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.

Para tornar o programa mais eficiente, o ciclo de *dynamic clamp* foi implementado de modo assíncrono, assim as condutâncias podem ser simplesmente adicionadas entre um ciclo básico de leitura do ADC e escrita do DAC e o tempo de execução do ciclo fica dependendo do número e complexidade das condutâncias que estão sendo simuladas.

A linguagem C++, além de ser uma das que produzem os programas executáveis mais rápidos, possui a vantagem de permitir criar as condutâncias e

sinápses como “classes”, desse modo, quando queremos criar uma outra sinápsse elétrica, basta criar um novo objeto, declarado como sendo da classe da sinápsse elétrica, o que é equivalente a uma simples declaração de variáveis. Outra vantagem é que cada objeto tem suas próprias variáveis, assim os parâmetros de cada sinápsse podem ser individualmente escolhidos e mantidos de modo muito mais seguro que quando usamos variáveis globais.

Para fazer as operações de ADC e DAC foi escolhida a placa de aquisição Digidata 1200A (Axon Instruments) por ser bastante comum em laboratórios de eletrofisiologia e permitir leitura e escrita rápidas mesmo em modo assíncrono. Novamente encontramos problemas para ter acesso às informações sobre o produto com a Axon, que se limitou a fornecer um programa em linguagem BASIC para aquisição de dados, do qual tiramos as informações sobre os endereços de I/O da placa. Porém, muitas outras informações tiveram que ser extraídas dos manuais de dados dos fabricantes de circuitos integrados existentes na placa, como por exemplo, a programação do relógio em tempo real da placa que só foi encontrada nas fichas de dados do *timer* de intervalo programável Intel 8254. Todo esse processo de busca das informações necessárias tornou o início do desenvolvimento do programa de *dynamic clamp* bastante lento.

Como estávamos usando linguagem C++ e Windows NT tivemos que resolver outro problema relacionado com o acesso a dispositivos de I/O pelos aplicativos. O Windows NT é mais estável que os outros sistemas operacionais Windows porque sua CPU trabalha em um modo protegido em que os programas possuem apenas uma área de memória para trabalhar e não podem acessar (nem mesmo apenas para leitura) as outras áreas de memória, sejam elas do sistema operacional ou de outros programas. O acesso a dispositivos de I/O (registradores de placas de aquisição, etc.) é exclusivo do sistema operacional, qualquer tentativa de acesso a esses dispositivos usando as funções normais da linguagem C++ resulta em uma mensagem de erro de falta de privilégio.

O único modo de liberar o acesso aos registradores de I/O de um determinado *hardware* é possuir o *software driver* para este dispositivo, o que não é fornecido pelo fabricante da placa e muito complicado para ser desenvolvido. Entretanto encontramos um programa que emula um *software driver* genérico, permitindo utilizar os dispositivos de I/O dentro de um programa em C++ Builder 4, o programa IOPort 2.1 (Salaj, 1999), que fornece funções de leitura e escrita em I/O que podem ser usadas dentro do programa C++ para acessar os dispositivos da placa de aquisição.

O painel de controle atual do DClamp4 é mostrado na Figura 5.1. Os valores indicados nos campos são valores padrão iniciais e podem ser alterados pressionando-se o botão do mouse quando este estiver sobre o campo e digitando um novo valor no teclado do computador.

Na figura 5.2 mostramos um exemplo do *dynamic clamp* conectando dois neurônios biológicos isolados. São mostrados o potencial de membrana das duas células assim como a corrente sináptica produzida pelo programa.

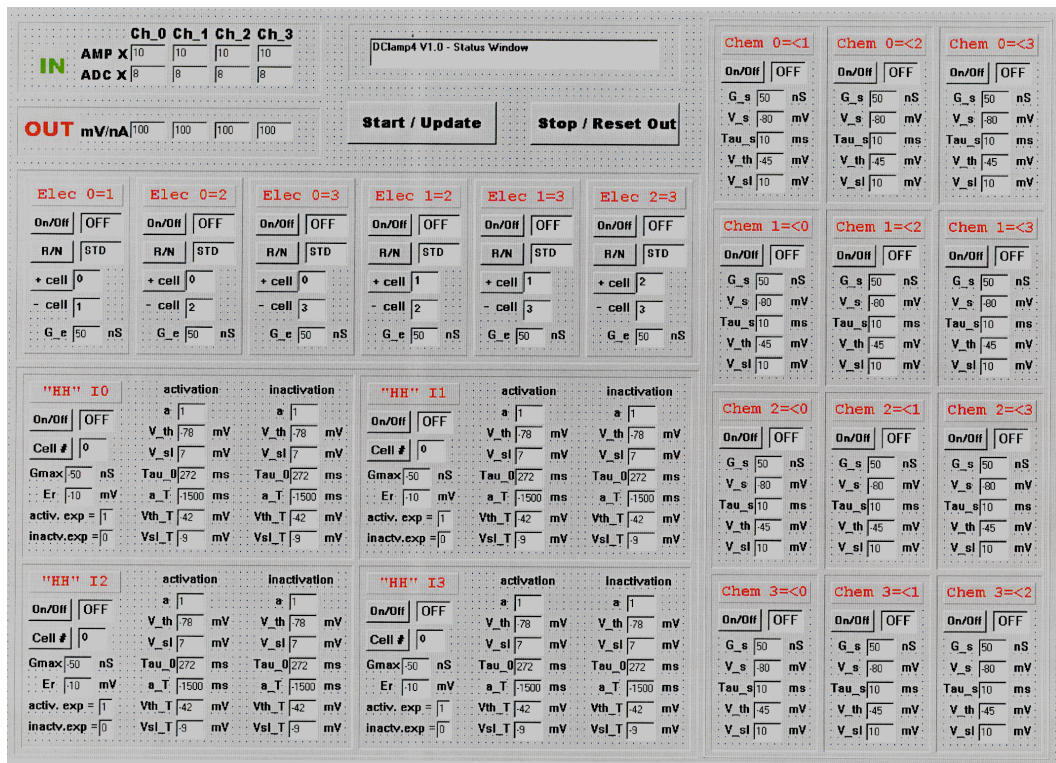


Figura 5.1 – Painel de controle do primeiro programa de dynamic clamp que desenvolvemos.

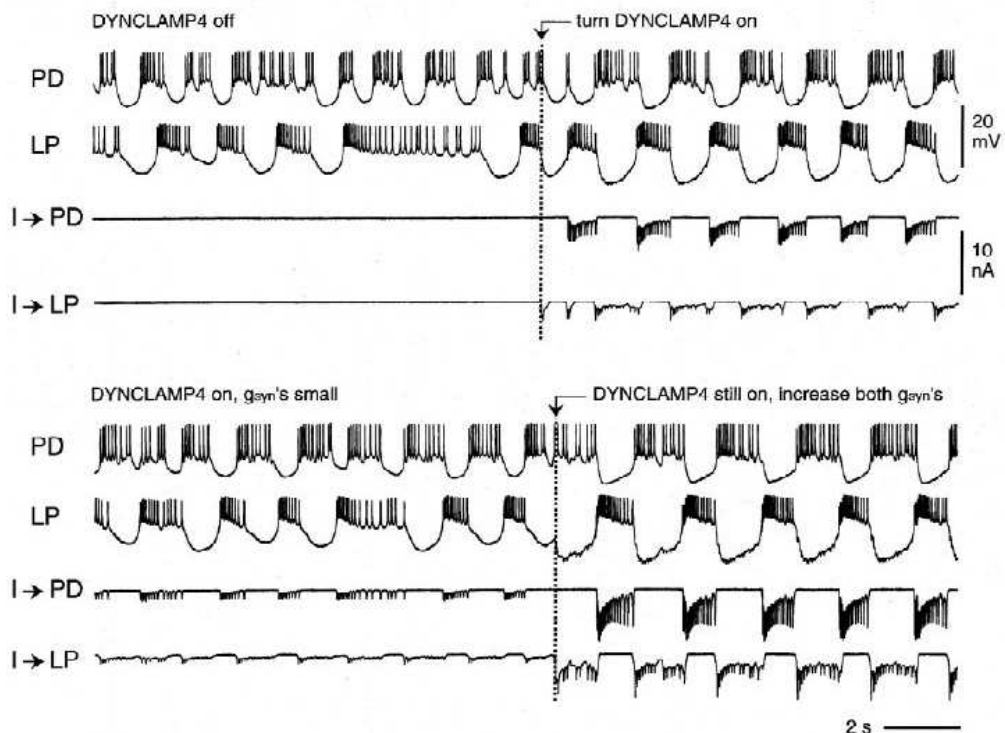


Figura 5.2 – O dynamic clamp usado para conectar dois neurônios do STG com mútua inibição e sinapses químicas do tipo *graded*. Extraída de Pinto *et al.*, 2001b.

Em um trabalho em colaboração com pesquisadores do Balaton Limnological Research Institute – Hungria, alterei o programa de dynamic clamp para injetar diferentes padrões aleatórios que podiam ser repetidos várias vezes para comparar a resposta dos neurônios a cada repetição. Usando neurônios identificados do molusco *Lymnaea stagnalis*, mostramos que a precisão dos potenciais de ação de resposta dos neurônios é mais confiável quando se usa um acoplamento eletrotônico (sinapse elétrica) do que quando o sinal de corrente é injetado diretamente na célula, muito embora a amplitude média da corrente injetada seja menor quando usamos a sinapse elétrica (Szücs et al., 2004, *ANEXO 19*). Este efeito é mostrado na figura 5.3.

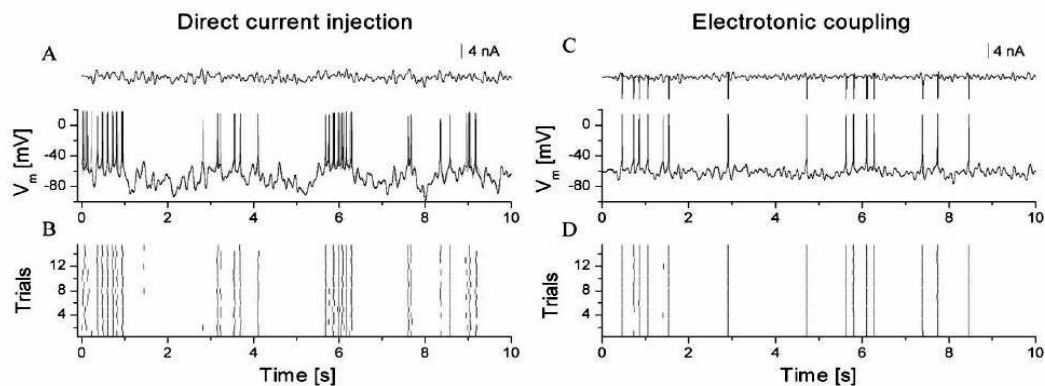


Figura 5.2 – O dynamic clamp usado para injetar um sinal aleatório repetidas vezes em neurônios biológicos. A precisão da resposta do neurônio biológico é maior quando se usa uma sinapse elétrica do que quando o sinal é injetado diretamente. Extraída de Szücs *et al.*, 2004.

5.3 - Limitações e desafios atuais

A principal limitação deste e de todos os programas de dynamic clamp é a mesma que apresentam os métodos de *voltage* e *current-clamp*: o problema de medir e fazer o *clamping* do potencial de membrana em situações em que o neurônio não é eletrotonicamente compacto. Como o *dynamic clamp* simula uma fonte puntual de condutâncias (ponta do microeletrodo) ele não descreve acuradamente a distribuição normal de canais iônicos na membrana da célula.

O ponto crucial para o bom funcionamento do programa *dynamic clamp* é que as correntes de saída sejam atualizadas rápido o suficiente para simular o efeito das condutâncias reais e manter uma medida acurada dos potenciais de membrana dos neurônios. Em um computador Pentium III - 450 MHz com todas as 16 sinapses químicas, 6 sinapses elétricas e as 4 condutâncias tipo “HH” ativadas, a velocidade de atualização da corrente ficou por volta de 4.9 kHz, o que permite acompanhar muito bem as mudanças rápidas do potencial de membrana mesmo durante os potenciais de ação produzidos pelos neurônios. Realizando apenas o ciclo de leitura do ADC e escrita no DAC a velocidade de atualização vai para 5.1 kHz, ou seja, a velocidade do ciclo está limitada apenas pelas instruções de acesso à placa de aquisição.

Com o domínio da técnica e o bom funcionamento do núcleo do programa, temos utilizado o ciclo de dynamic clamp em diversos programas descritos em outros capítulos desta resenha. Atualmente estamos trabalhando em uma versão Linux Real-Time do programa dynamic clamp que permitirá usar placas ADC/DAC comerciais e tirar vantagem dos processadores de 64 bits.

6. “Neurônios eletrônicos”

6.1 - Modelo dinâmico do tipo Hindmarsh-Rose

É possível utilizar modelos simplificados que capturem as características qualitativas mais importantes do comportamento dinâmico sem a necessidade de um número elevado de equações que descrevam detalhadamente o comportamento de cada tipo de condutância presente na membrana do neurônio já que diversas análises topológicas da atividade de neurônios isolados do STG mostraram que a dinâmica pode ser descrita adequadamente usando-se apenas de 3 a 4 graus de liberdade (Selverston et al., 2000, *ANEXO 26*).

Uma visão geral simplificada dos processos neurais pode ser obtida usando-se essas “caricaturas” de neurônios (Marder e Selverston, 1992), ou seja, modelos baseados em equações simplificadas, como o de Fitzhugh (1961), Morris e Lecar (1981) ou Hindmarsh e Rose (HR) (1984) (Kepler *et al.*, 1990; Skinner *et al.*, 1994; Abarbanel *et al.*, 1996, Manor *et al.*, 1999).

Tais modelos simplificados são muito úteis para o estudo de redes neurais compostas por vários desses componentes e suas interconexões, pois o número reduzido de equações pode ser simulado muito mais rapidamente em um computador e, quando as não linearidades são polinomiais, também permitem a implementação de circuitos eletrônicos analógicos (integradores) que emulam o potencial de membrana da célula (Pinto *et al.*, 2000b, *ANEXO 27*). Esses “neurônios eletrônicos”, quando sintonizados adequadamente, não apenas comportam-se de maneira similar aos neurônios biológicos mas também são capazes de responder a estímulos em tempo real, podendo ser conectados aos neurônios biológicos formando circuitos mistos ou substituindo células biológicas danificadas (Szücs *et al.*, 2000).

O modelo dinâmico fenomenológico conhecido como Hindmarsh-Rose (com três equações diferenciais acopladas de primeira ordem é descrito por:

$$\begin{aligned} \dot{x} &= ay(t) + bx^2(t) - cx^3(t) - dz(t) + I \\ \dot{y} &= e - fx^2(t) - y(t) \\ \dot{z} &= \mu - z(t) + S(x(t) + h) \end{aligned} \quad (6.1)$$

A variável x corresponde ao potencial de membrana V do neurônio e a variável y corresponde à corrente elétrica que flui através da membrana da célula, I é uma corrente externa que controla o funcionamento (excitação intrínseca) do neurônio e pode incluir termos de corrente sináptica que representem as conexões em uma rede. Este modelo foi concebido inicialmente com duas equações diferenciais que modelavam os potenciais de ação e foram deduzidas através de ajustes de curvas a dados experimentais obtidos em experimentos de voltage clamp em neurônios do molusco *Lymnaea stagnalis*. Em Hindmarsh & Rose, 1984, o modelo foi estendido através da inclusão da terceira equação diferencial de forma a descrever também os *bursts* apresentados por neurônios reais.

Um dos sucessos desse modelo simplificado é a presença de comportamento caótico similar ao encontrado em neurônios do STG quando sinápticamente isolados.

Entretanto o comportamento caótico neste modelo tridimensional é confinado a uma região pequena do espaço de parâmetros, o que não corresponde ao fato de sempre encontrarmos comportamento caótico nos neurônios biológicos, muito embora cada experimento seja realizado em condições ligeiramente diferentes de temperatura, concentrações da solução fisiológica, além das diferenças de animal para animal. Desenvolvemos por isso um novo modelo do tipo HR com quatro equações diferenciais (HR4D) da forma:

$$\begin{aligned}
 \frac{dx}{dt} &= ay(t) + bx^2(t) - cx^3(t) - dz(t) + I \\
 \frac{dy}{dt} &= e - fx^2(t) - y(t) - gw(t) \\
 \frac{dz}{dt} &= \mu - z(t) + S(x(t) + h) \\
 \frac{dw}{dt} &= v - kw(t) + r(y(t) + l) ,
 \end{aligned}
 \tag{6.2}$$

onde $a, b, c, d, I, e, f, g, \mu, S, h, v, k, r$ e l são constantes que determinam a dinâmica de correntes e condutâncias baseada numa representação polinomial. Neste modelo, $x(t)$ é o potencial de membrana da “célula”, $y(t)$ representa uma corrente iônica rápida e $\mu \ll 1$ foi escolhido de modo que $z(t)$ representa uma corrente lenta. Quando $g=0$ recupera-se o modelo HR original.

A equação que determina $w(t)$ representa um processo dinâmico ainda mais lento que z ($v < \mu \ll 1$) e foi incluída neste modelo para expressar a troca de cálcio entre os depósitos intracelulares (retículo endoplasmático) e o citoplasma que parecia estar relacionada ao aparecimento de caos em modelos mais complexos do tipo HH (Falcke *et al.*, 2000). Os neurônios HR4D possuem as regiões caóticas bem mais largas, provavelmente pelas mesmas razões que a dinâmica do cálcio quando inserida no modelo HH é capaz de produzir comportamento caótico.

Em um trabalho concluído recentemente (Denker *et al.*, 2005, ANEXO 18), iniciado durante meu pós-doutoramento em San Diego durante a orientação da iniciação científica do estudante Michael Denker, mostramos através de simulações numéricas que um circuito composto por neurônios-modelo HR4D conectados por sinapses elétricas para simular o circuito marca-passo do CPG pilórico do STG, mostrado na Figura 6.1, quando forçado por um sinal periódico apresenta diversos comportamentos não-lineares como travamentos de frequências e regiões caóticas, do mesmo modo que ocorre com o circuito marca-passo biológico quando submetido a experimento semelhante (Szücs *et al.*, 2001). Na figura 6.2 mostramos o resultado obtido para frequências de forçamento entre 0 e 4 Hz.

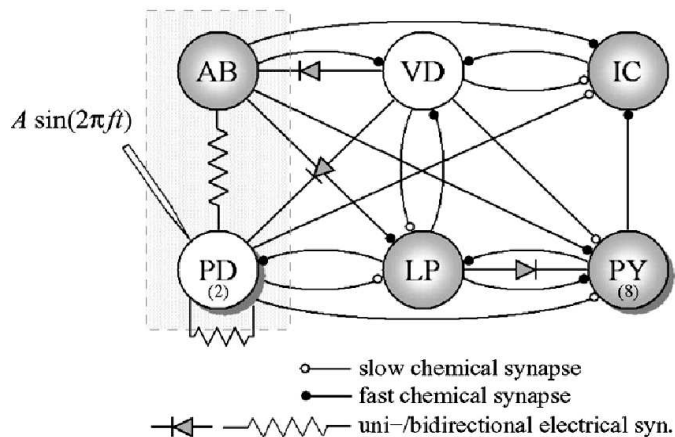


Figura 6.1 – Diagrama do CPG pilórico do STG. O retângulo mostra o subcircuito marcapasso que foi simulado usando-se 3 neurônios-modelo HR4D. Nas simulações numéricas uma corrente senoidal foi aplicada a um dos neurônios PD. Extraída de Denker et al., 2005.

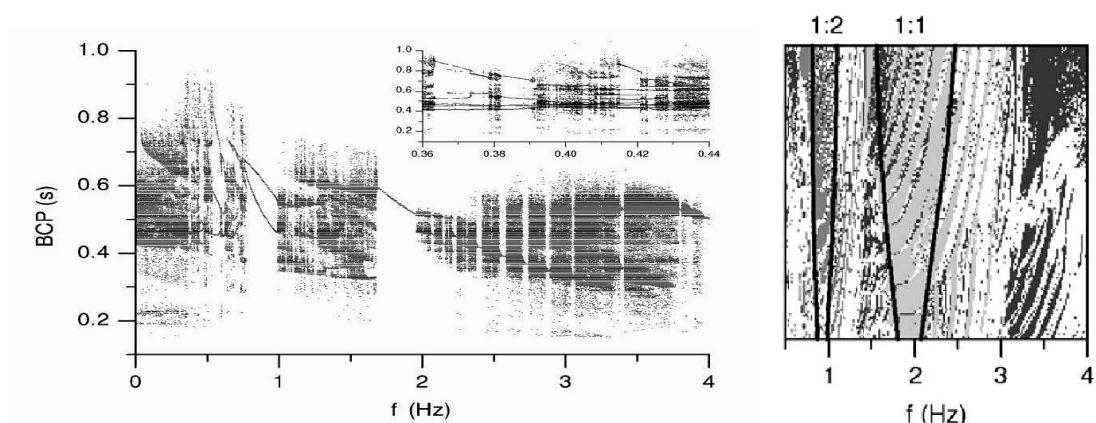


Figura 6.2 – Esquerda: duração dos bursts (BCP) do circuito marcapasso simulado em função da frequência da corrente senoidal injetada em um dos PDs. São observadas várias alternâncias entre janelas periódicas e caóticas. Direita: espaço de parâmetros (amplitude vs. frequência) com os diferentes modos de travamento em tons de cinza. As regiões 1:2 e 1:1 representam as línguas de Arnold encontradas no experimento com neurônios biológicos. A amplitude vai de 0 a 2V. Adaptada de Denker et al., 2005

6.2 - Implementação dos neurônios em circuito analógico e experimentos

Projetamos e construímos uma versão eletrônica analógica dos neurônios modelo HR4D usando circuitos integradores para gerar a voltagem de membrana a partir das equações (6.2). Foram utilizados componentes eletrônicos comuns com 10% de tolerância em seus valores nominais que, além de serem baratos e fáceis de se

adquirir permitem pequenas variações de circuito para circuito e também em função da temperatura, assim como ocorre com os neurônios biológicos.

Nas figuras 6.3 e 6.4 mostramos, respectivamente, o esquema elétrico do neurônio eletrônico 4D (que pode ser convertido em 3D abrindo-se o *jumper* JP1 que conecta a quarta equação à segunda) e o circuito montado em uma placa de circuito impresso.

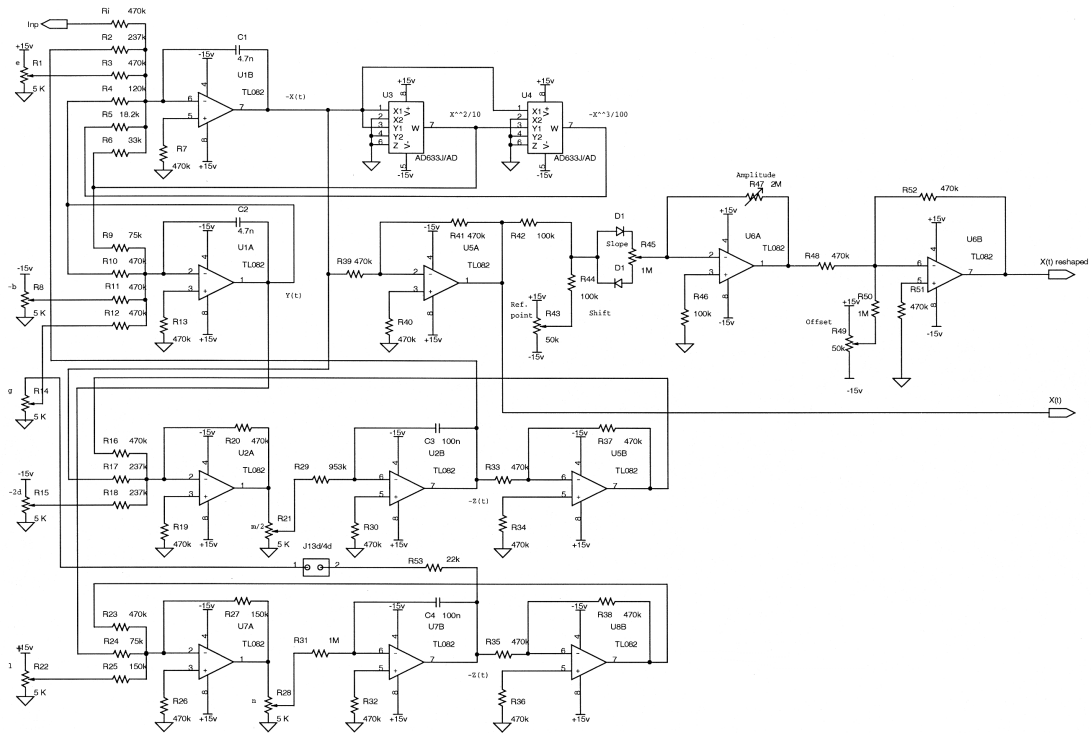


Figura 6.3 –Esquema elétrico do neurônio analógico 4D. O *jumper* J1 conecta a saída da quarta equação à segunda equação e quando removido transforma o neurônio 4d em um neurônio 3D (sem a equação que descreve a dinâmica intracelular do cálcio). Alguns parâmetros foram mantidos fixos por valores de resistores do circuito, os valores de b , d , I , g , μ , v e l são ajustados em trimpots.

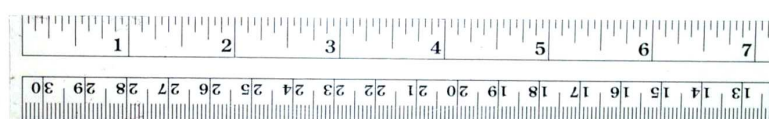
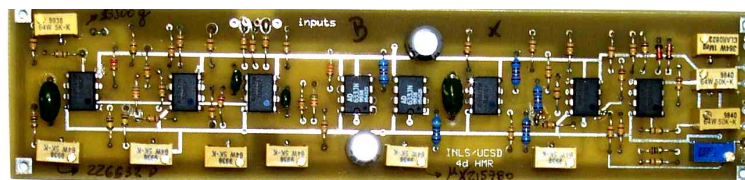


FIGURA 6.4 Fotografia de uma placa de circuito impresso na qual foi montado um “neurônio eletrônico” – implementação analógica do modelo HR4D.

O circuito formado pelos amplificadores operacionais U6A e U6B na Figura 6.3 é um amplificador não linear e foi acrescentado ao circuito do neurônio analógico para permitir remodelar o sinal de saída $x(t)$. Utilizando este circuito, podemos amplificar ou reduzir diferentes partes do sinal, ajustar sua amplitude total e seu nível DC. Este ajustes são muito importantes quando fazemos experimentos conectando neurônios artificiais e biológicos e são usados para produzir a partir de $x(t)$ um sinal (voltagem de membrana do neurônio eletrônico) que tenha a mesma amplitude total, relação entre as amplitudes dos potenciais de ação e regiões de hiperpolarização entre *bursts* e nível DC que os apresentados pelo neurônio biológico ao qual será conectado.

Ajustando os parâmetros dos EN's é possível reproduzir qualitativamente todos os modos de operação observados nos neurônios vivos isolados do STG. Um exemplo de um EN preparado para funcionar de modo caótico é mostrado na figura 6.5.

Investigamos o comportamento de nossos EN's 4D quando conectados entre si do mesmo modo que foi feito com os neurônios biológicos do STG (Elson *et al.*, 1998) e também tentamos reproduzir os resultados obtidos quando um EN 3D foi conectado a um neurônio do STG (Szücs *et al.*, 2000).

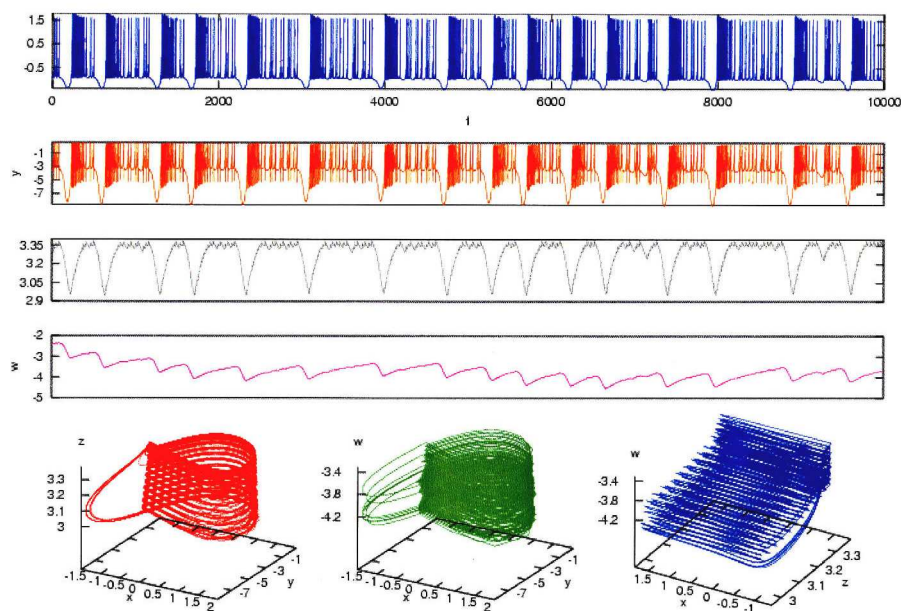


FIGURA 6.5 - Séries temporais obtidas do modelo Hindmarsh-Rose. Primeiro traço em azul: $x(t)$ – análogo do potencial de membrana, as outras variáveis do modelo são plotadas para mostrar o comportamento irregular similar ao do neurônio LP. Na parte inferior são plotados vários atratores também para comparação com os experimentos.

Para fazer as conexões entre os EN's e entre EN's e neurônios biológicos foram construídas versões eletrônicas analógicas de sinapses químicas e elétricas e também utilizamos o programa de *Dynamic Clamp*.

Para emular as sinapses químicas são produzidas correntes elétricas que, ao serem injetadas nos neurônios, produzem um efeito equivalente às correntes geradas

pela abertura/fechamento de canais iônicos da membrana celular devido à ação de neuro-transmissores. O modelo utilizado para calcular a corrente a ser injetada em um neurônio (célula pós-sináptica) nas sinapses químicas é baseado nas mesmas equações usadas no programa de *Dynamic Clamp*.

O diagrama esquemático do circuito analógico utilizado para implementar as sinapses químicas é mostrado na Figura 6.6.

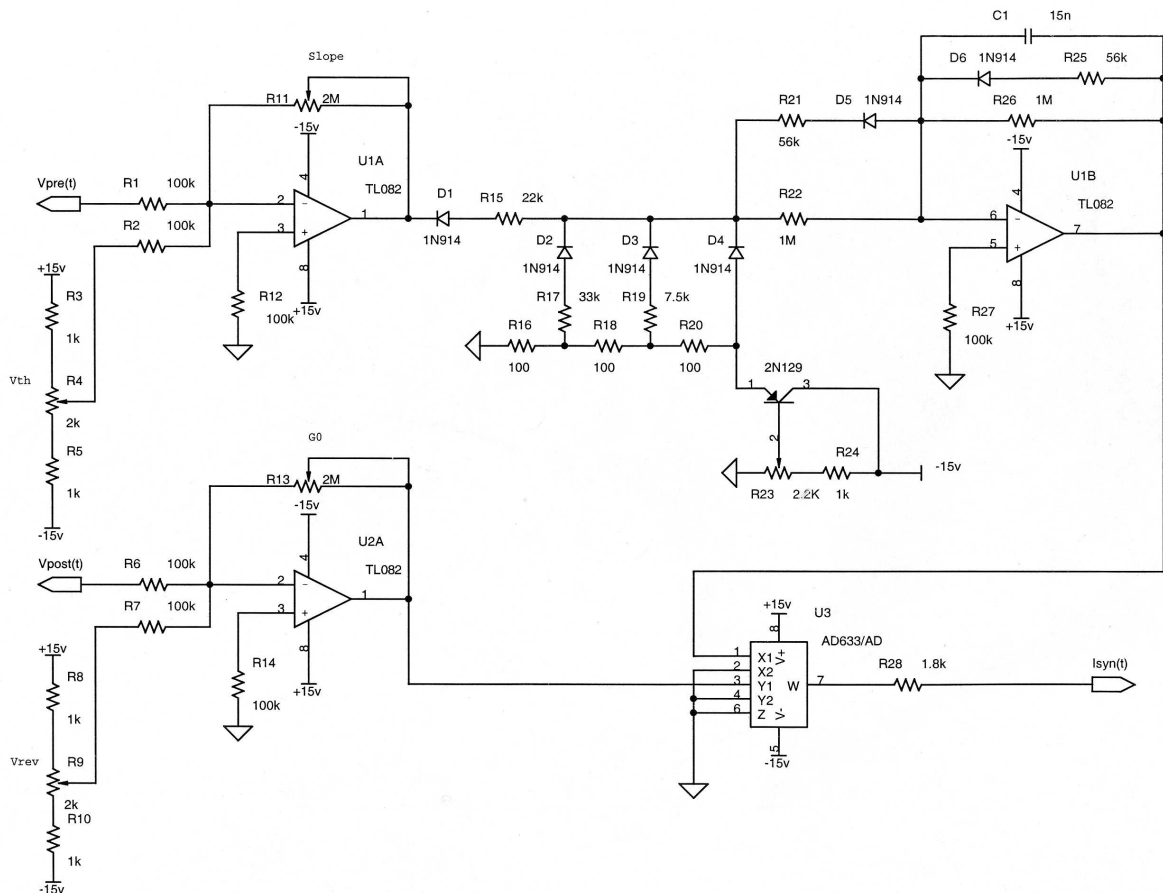


Figura 6.6 - Esquema elétrico de uma sinapse química analógica.

Novamente, optamos por componentes eletrônicos comuns na construção das sinapses químicas. Como não é possível implementar com circuitos eletrônicos analógicos simples a função tangente hiperbólica, fizemos uma aproximação dessa função usando um circuito que possui uma curva de resposta de corrente com 2 inclinações diferentes e um valor de saturação, simulando a parte positiva da função. Este circuito é formado pelos diodos D2, D3 e D4, e os resistores R16, R18 e R20. O transistor VT1 produz o potencial referência de saturação e o diodo D1 simula a desativação quando $V_{pre} < V_{th}$.

A implementação analógica de uma sinapse elétrica é bem mais simples. Apenas um circuito subtrator que calcula a diferença de tensão entre o potencial de membrana das duas “células” e injeta uma corrente proporcional a essa diferença em um dos neurônios e a mesma intensidade de corrente é injetada no outro neurônio porém com o sinal invertido.

Sinapses elétricas com condutância negativa (biologicamente não realísticas) também podem ser geradas e simulam de modo grosseiro o efeito de sinapses

químicas inibidoras rápidas (constante de tempo bem pequena). O circuito eletrônico que implementa a sinápsse elétrica é mostrado na Figura 6.7.

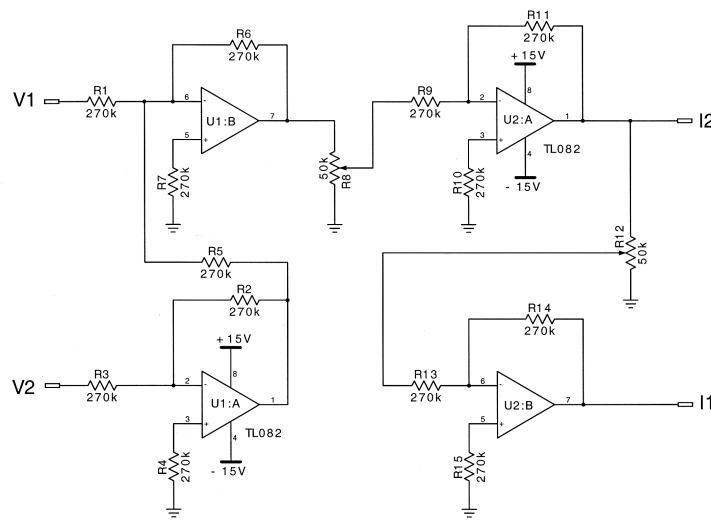


Figura 6.7 - Esquema elétrico de uma sinápsse elétrica analógica.

O comportamento de um par de ENs conectados (Pinto *et al.*, 2000b, *ANEXO 27*) com sinápses químicas e elétricas utilizando as implementações analógicas assim como o programa de dynamic clamp reproduziram várias características observadas nos circuitos biológicos. Os EN's foram colocados em um estado inicial (através do ajuste de seus parâmetros) em que a voltagem de membrana apresentava um regime de *bursts* irregular, similar ao encontrado nos neurônios biológicos PD quando isolados do resto do circuito pilórico do STG, mas outros regimes de oscilação inicial foram testados, como por exemplo um dos neurônios apenas disparando tonicamente potenciais de ação sem regiões de hiperpolarização ou ambos nessa segunda condição dinâmica inicial e o resultado obtido após a conexão entre os EN's ser estabelecida foi invariavelmente o mesmo. Os EN's não só reproduzem o comportamento observado em neurônios biológicos quando conectados entre si, mas também quando conectados aos neurônios biológicos em circuitos híbridos.

Observamos vários tipos de comportamento, desde a completa regularização e sincronização das oscilações dos EN's até comportamentos complexos e caóticos, dependendo do tipo e da intensidade das conexões, conforme mostrado nas figuras 6.8 e 6.9. Também pudemos observar que a mútua inibição através de sinápses químicas produz uma regularização do comportamento (*bursts* em anti-fase) melhor que a produzida por sinápses elétricas (*bursts* em fase). Deste modo, podemos concluir que o motivo pelo qual na CPG do STG de crustáceos (e em muitas outras CPG's de vertebrados e invertebrados) existem apenas sinápses elétricas e sinápses químicas inibidoras (Elson *et al.*, 1999) vem do fato desses dois tipos de sinápses serem os melhores para produzir cada um dos dois comportamentos (*bursts* regulares em fase ou anti-fase, respectivamente).

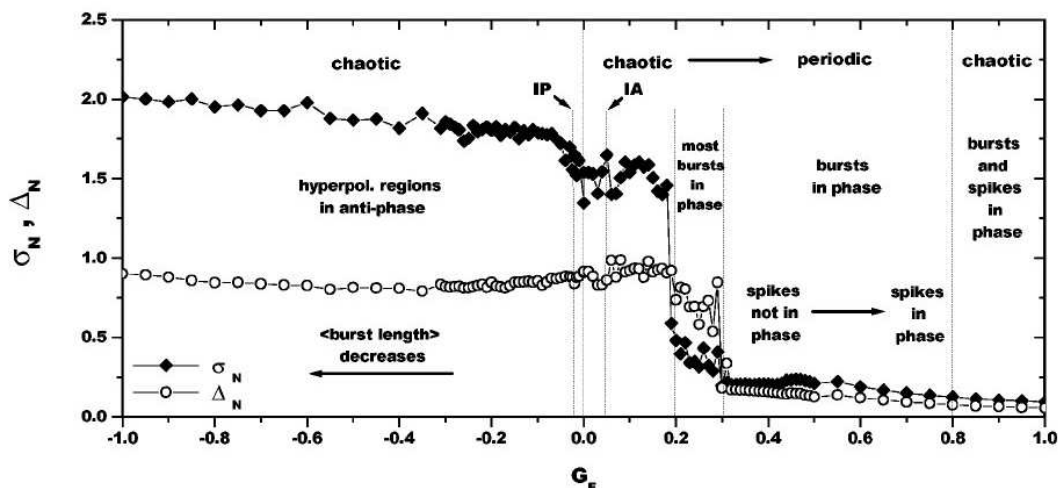


Figura 6.8 – Comportamento de dois neurônios eletrônicos HR4D conectados por uma sinapse elétrica com condutância G_E . σ_N e Δ_N são respectivamente o desvio padrão normalizado e o desvio máximo normalizado da diferença entre os potenciais de membrana dos dois ENs após aplicação de um filtro passa-baixas. Extraída de Pinto *et al.*, 2000b.

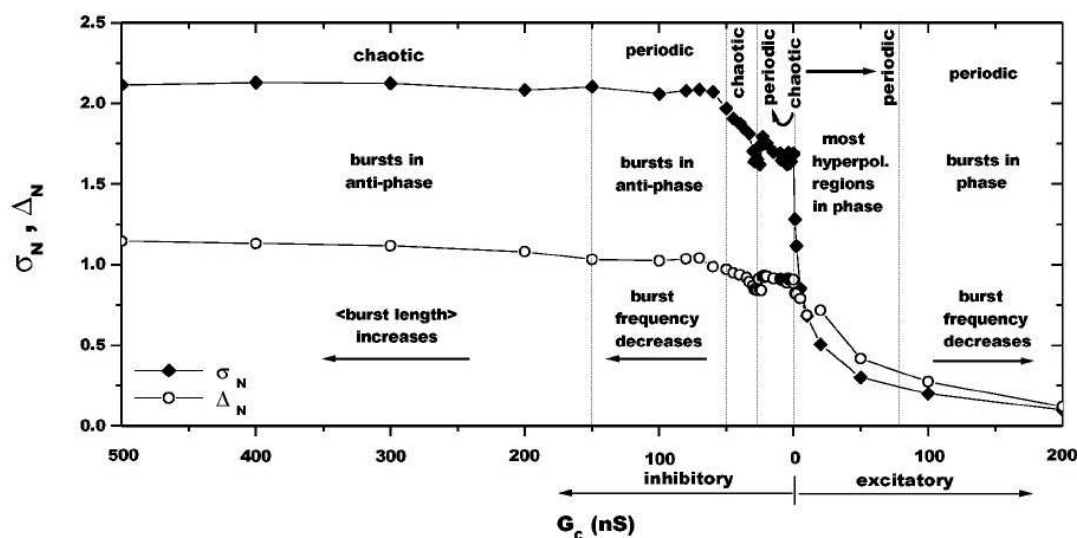


Figura 6.9 - - Comportamento de dois neurônios eletrônicos HR4D conectados por uma sinapse química com condutância máxima G_c . σ_N e Δ_N são respectivamente o desvio padrão normalizado e o desvio máximo normalizado da diferença entre os potenciais de membrana dos dois ENs após aplicação de um filtro passa-baixas. Extraída de Pinto *et al.*, 2000b.

Estes resultados com neurônios eletrônicos HR4D e a semelhança de seu comportamento coletivo com o comportamento de neurônios biológicos também foram discutidos em um trabalho de revisão (Selverston *et al.*, 2000, *ANEXO 26*).

Também utilizamos os neurônios eletrônicos para testar várias idéias sobre como uma informação pode ser propagada em um circuito formado por neurônios caóticos. Para aplicar a teoria da informação (Shannon, 1948; Borst e Theunissen, 1999) aos sinais obtidos de nossos ENs, tivemos que definir uma maneira de codificar os sinais. Nestes primeiros trabalhos definimos um evento como o início da hiperpolarização do neurônio. Se esta hiperpolarização é suficiente para terminar uma série de potenciais de ação espontâneos ou se esses eventos são acrescidos a um neurônio que já esteja apresentando hiperpolarizações espontâneas esses eventos definem o que chamamos de código de “bursts”. Um exemplo deste tipo de código é mostrado na Fig. 6.10. Uma longa série temporal do potencial de membrana com duração total é medida e dividida em N partes de duração ΔT . Em seguida procura-se em cada pequena parte por um cruzamento descendente do sinal pelo nível de gatilho V_{thres} . Toda vez que tal cruzamento é detectado um bit “1” é atribuído a parte do sinal onde o cruzamento ocorreu. A cada uma das partes remanescentes do sinal, nas quais não ocorreu o cruzamento no sentido procurado, é atribuído um bit “0”. Desse modo forma-se uma string com N bits.

O próximo passo é a construção de palavras digitais com L bits de comprimento. Começando pelo primeiro bit da string de N bits, pegamos L bits e construímos a primeira palavra W_1 . Movendo ΔT para a direita (começando pelo próximo bit) na string usamos os próximos L bits para criar a palavra W_2 . Repetindo este processo até que toda a string tenha sido usada formamos um total de $N-L+1$ palavras de L bits. Neste esquema de codificação teremos um conjunto de $N-L+1$ itens $\{W_1, W_2, \dots, W_{N-L+1}\}$ cada um composto por 2^L palavras distintas $\{w_j : w_1, w_2, \dots, w_{2^L}\}$.

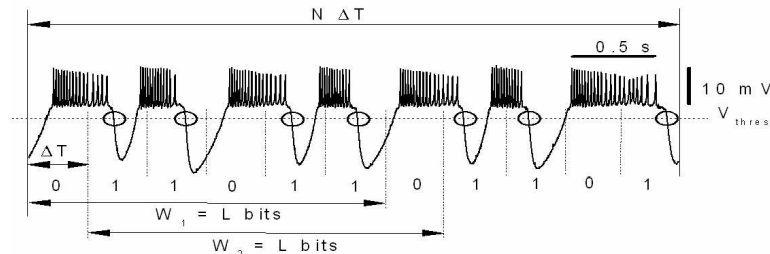


FIGURA 6.10 - Codificação de um sinal neural usando código de burst. Um sinal de comprimento total $N\Delta T$ é dividido em N janelas iguais de duração ΔT . Uma string de N bits é construída procurando em cada janela pela ocorrência de um evento, marcados por círculos na figura (neste exemplo o cruzamento do nível arbitrário V_{thres} pelo potencial de membrana durante a hiperpolarização da célula). As palavras são formadas pegando-se seqüências de L bits começando a partir do primeiro bit da string e movendo-se um bit à direita para formar uma nova palavra.

Calculando a frequência de ocorrência de cada palavra distinta w_j podemos determinar a distribuição de probabilidades $P_w(w_j)$. Se tivermos dois sinais diferentes, podemos codificá-los simultaneamente, o que nos permite calcular suas probabilidades conjuntas e sua Informação Mútua Média (Shannon, 1948).

Muitas vezes é possível que a informação sobre um determinado estímulo produza um comportamento mais complexo da célula. Isso é especialmente verdade quando usamos neurônios que possuem sua própria dinâmica intrínseca e produzem informação que não estava presente no estímulo. Por exemplo, suponha que uma seqüência de spikes é usada para inibir uma célula que está apresentando bursts

expontâneos de spikes. As vezes o estímulo inibidor ocorre em um momento em que faz com que a célula hiperpolarize, outras vezes o estímulo pode ocorrer quando o neurônio apenas começou um burst e é bem menos sensível à inibição, neste caso o estímulo é apenas capaz de inibir a produção de um único spike, mas não se observa nenhuma hiperpolarização, como mostramos na Fig. 6.11. Se utilizarmos o esquema de detecção de eventos a partir do cruzamento de um nível de gatilho pelo potencial de membrana da célula apenas uma pequena quantidade da informação contida na seqüência de estímulos poderá ser detectada. Se colocarmos o valor do gatilho em um nível mais alto poderemos detectar mais eventos (marcados na figura com asteriscos), melhorando a medida da informação sobre os estímulos, mas alguns eventos (marcados com h) nunca serão detectados pelo critério do gatilho, a não ser que o gatilho seja colocado em um nível tão alto que todos os spikes da célula serão detectados erroneamente como eventos.

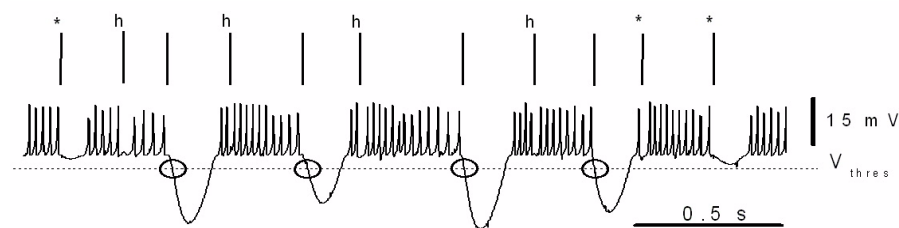


FIGURA 6.11 - Informação “oculta” em um sinal neural. No traço superior é mostrada uma seqüência de spikes aplicada como sinal inibidor de uma célula cujo potencial de membrana é mostrado no traço inferior. Usando um nível de gatilho para detectar os eventos (hiperpolarizações da célula) somente é possível discriminar parte da informação introduzida na célula pela seqüência de spikes. Se escolhermos um valor mais alto para V_{thres} o efeito dos spikes marcados com asterisco pode ser detectado, mas alguns dos eventos (marcados com h) são impossíveis de ser discriminados usando este tipo de código. Neste caso, a informação sobre a seqüência de entrada não pode ser lida usando um único código, ela está parcialmente armazenada no código de burst e parcialmente armazenada na frequência de spikes da célula.

Neste caso, a informação contida na seqüência de estímulos ainda encontra-se presente no potencial de membrana da célula, porém está “oculta” para o nosso método de codificação que usa apenas níveis de gatilho ajustados para detectar hiperpolarizações. Parte da informação está contida nas hiperpolarizações e parte está contida nos intervalos entre spikes (ISI) da célula.

Desse modo, além da escolha de um bom código ser crucial para a análise de dados usando a teoria da informação, quando usamos elementos dinâmicos, o próprio código é dinamicamente alterado durante o processamento da informação, dificultando ainda mais a tarefa da análise usando teoria da informação clássica.

A maioria dos trabalhos sobre aprendizado e processamento de informação em redes neurais usam como parâmetro a ser ajustado durante o aprendizado a intensidade da conexão entre as células pré e pós-sináptica. Porém, um grande numero de experimentos biológicos vem demonstrando que as sinapses possuem uma grande diversidade de características dinâmicas diferentes, mesmo quando pertencem a mesma célula.

Construímos um pequeno canal de processamento neural usando neurônios analógicos (ENs) conectados por sinapses analógicas e também por sinapses simuladas através de *dynamic clamp* conforme descrito no esquema da Fig. 6.12.

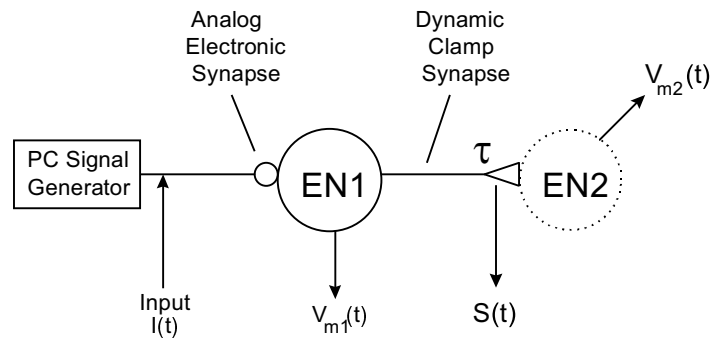


FIGURA 6.12 - Esquema experimental. O sinal de entrada consiste de distribuições Gaussianas unimodais ou bimodais de intervalos entre spikes (ISI). O sinal de entrada $I(t)$ é gerado usando um conversor digital-analógico controlado por um computador (PC). Séries temporais do sinal de entrada, potencial de membrana dos neurônios e ativação da sinapse ($S(t)$) são digitalizadas e armazenadas para posterior análise quando calculamos a informação mútua média (AMI) entre o sinal de entrada ($I(t)$) e $V_{m1}(t)$, assim como a AMI entre $I(t)$ e $V_{m1}(t)$.

O sinal de entrada é gerado numericamente e consiste de seqüências longas de spikes aleatórios com distribuição unimodal ou bimodal de intervalos entre spikes (ISI). O neurônio EN1 foi preparado para apresentar spikes irregulares (quando isolado do circuito) porém próximo da transição para spike-burst caótico. O neurônio EN2 foi colocado em um regime de burst periódico próximo do regime de burst caótico. Estes comportamentos foram selecionados por enfatizar o que ocorre com a informação contida no sinal de entrada ao ser processada pelos ENs. Em um trabalho anterior (Eguia et al., 2000) foi verificada a recuperação da informação em simulações numéricas de uma rede neural deste tipo. Verificamos em nossos experimentos com ENs que, na verdade, a recuperação da informação “oculta” ocorre na sinapse e não devido a dinâmica do neurônio pós-sináptico como havia sido proposto naquele trabalho. Na verdade a informação não foi perdida, foi transformada pela dinâmica não-linear intrínseca do neurônio EN1 e ainda esta contida em seu potencial de membrana, porém não pode ser completamente recuperada quando usamos um código simples. A sinapse dinâmica é capaz de fazer com que a informação volte a ser contida em um código simples e permite que ela seja recuperada desde que as características da sinapse e da célula pós-sináptica sejam escolhidas apropriadamente.

Maiores detalhes deste experimento, assim como os resultados numéricos obtidos com a aplicação da Teoria da Informação, encontram-se em Rabinovich et al., 2001, ANEXO 24 e em Rabinovich et al., 2002, ANEXO 21.

Uma hipótese muito interessante foi levantada a partir desses resultados preliminares: durante o aprendizado as alterações sofridas pelas sinapses dinâmicas levam a mudanças na eficiência da transmissão de informação de diferentes maneiras, dependendo das características específicas dos padrões temporais do sinal de entrada. A constante de tempo da sinapse pode ser sintonizada para obter um máximo da recuperação de informação para uma específica célula pós-sináptica. Como as células biológicas usam sinapses com diferentes constantes de tempo (entre outras características) para conectar-se a diferentes células, um diferente conteúdo de informação pode ser transmitido para cada uma das células alvo. Desse modo, a alteração de parâmetros da dinâmica da sinapse e não apenas a sua máxima condutância deve contribuir para o processo de aprendizado em redes neurais (Rabinovich et al., 2001, ANEXO 24 ; Rabinovich et al., 2002, ANEXO 21).

7. Circuitos híbridos

Para ilustrar um tipo de trabalho que temos realizado com circuitos híbridos (Reyes, 2005, *ANEXO 53*), iremos utilizar o CPG gástrico de crustáceos. Além do CPG pilórico, responsável pela filtragem e bombeamento do alimento em digestão para o intestino, o STG possui um CPG gástrico (figura 7.1), 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.

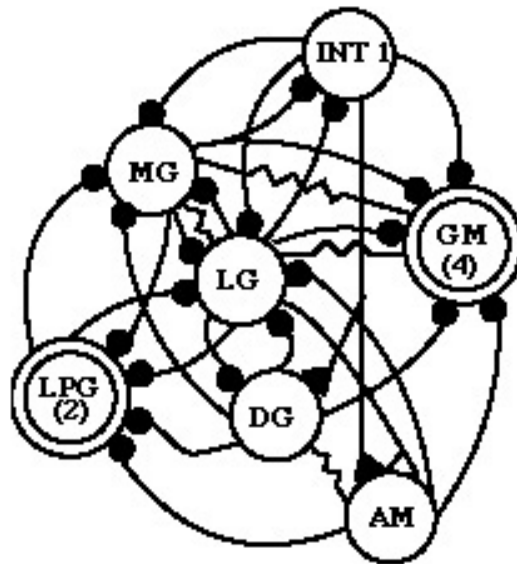


Figura 7.1 - Esquema de conexões sinápticas do CPG gástrico do STG. INT 1: interneurônio 1, MG: neurônio gástrico medial, LG: neurônio gástrico lateral, DG: neurônio gástrico dorsal, AM: neurônio anterior médio, GM: neurônios da moela gástrica, LPG: neurônios gástricos laterais posteriores. Os pequenos 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

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

O modelo SN é um dos modelos tipo HH mais simples que apresenta fortes 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

$$\tau_i^m \frac{dm_i}{dt} = m_i^\infty - m_i, \quad \tau_i^h \frac{dh_i}{dt} = h_i^\infty - h_i.$$

Onde

$$m_{Na}^\infty = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{V + 25.5}{-5.29}\right)}, \quad m_K^\infty = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{V + 12.3}{-11.8}\right)},$$

$$m_H^\infty = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{V + 85}{Slope_H^m}\right)}, \quad h_{Na}^\infty = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{V + 48.9}{5.18}\right)},$$

$$\tau_{Na}^m = 2.64 - 2.52 \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{V + 120}{-25}\right)}, \quad \tau_K^m = 14.4 - 12.8 \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{V + 28.3}{-19.2}\right)},$$

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

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

O parâmetro $Slope_H^m$ é usado para controlar 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 cada uma das correntes.

Neste exemplo os parâmetros utilizados foram $C= 0.628$ nF, $A=0.628 \times 10^{-3}$ cm²; $E_{Na} = 50.0$ mV, $E_K = -80.0$ mV, $E_H = -20.0$ mV, $E_{fuga} = -50.0$ mV; $g_{Na} = 200.0$ mS/cm², $g_{Kd} = 125.0$ mS/cm², $g_H = 5.12$ mS/cm², $g_{fuga} = 0.04$ mS/cm², $Slope_m^H = 1.925$. 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_{inf}^H e τ_m^H que determinam o comportamento da corrente de hiperpolarização em função do potencial de membrana são mostradas na figura 7.2. Podemos observar que a ativação da corrente, dada pela variável m_{inf}^H (em azul), só ocorre para valores abaixo de -70 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 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.

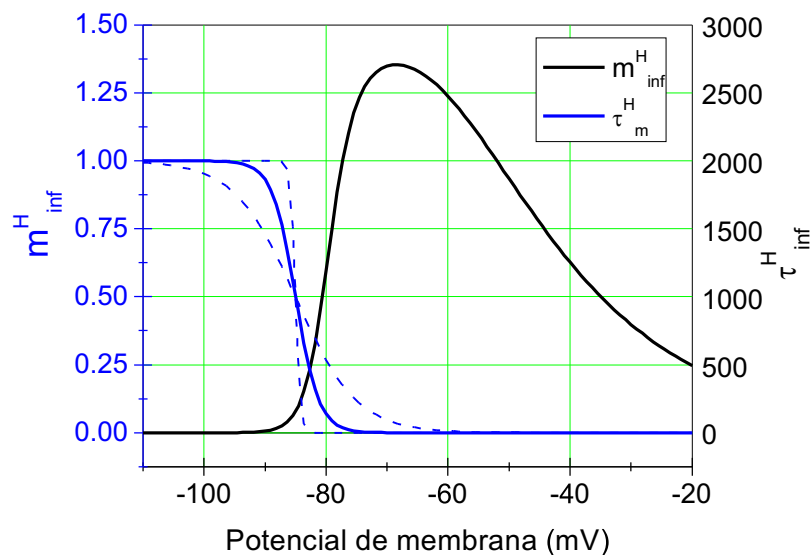


Figura 7.2 - Funções m_{inf}^H (em azul, escala à esquerda) e τ_m^H (em preto, escala à direita) que determinam a função de ativação da corrente de hiperpolarização em função do potencial de membrana para o modelo SN. As linhas tracejadas mostram o efeito de alterações no parâmetro $Slope_m^H$.

Um 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 figura 7.3. Com o circuito intacto, o CPG gástrico produz um ritmo regular com período de ~ 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 um dos grandes responsáveis pela geração de ritmo no CPG gástrico.

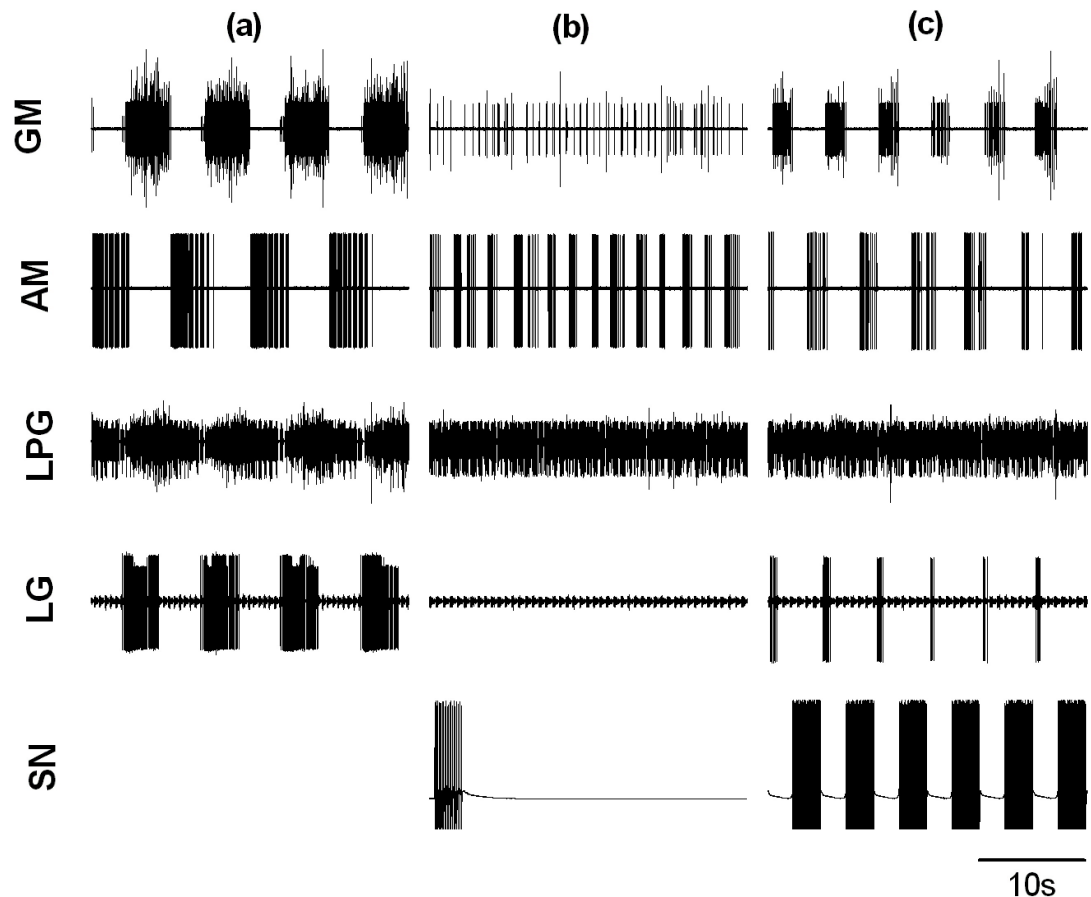


Figura 7.3 - Medidas extracelulares no experimento em que um neurônio modelo SN foi conectado ao CPG gástrico. GM – neurônio da moela gástrica, AM – neurônio medial anterior, LPG – neurônio gástrico posterior lateral, LG – neurônio gástrico lateral, SN – neurônio modelo. (a) Atividade neural do circuito 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 após uma salva transiente (mostrada na figura) e para apresentar forte rebote pós-inibitório. (c) Conectando LG e SN 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. Caos e centros geradores de padrões

CPGs 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. Realizamos simulações computacionais de modelos da atividade elétrica de CPGs para investigar o fato experimental de organismos vivos utilizarem neurônios caóticos para produzir padrões periódicos (Reyes, 2005, *ANEXO 53*).

Utilizamos inicialmente dois modelos de atividade neural, um modelo fenomenológico do tipo Hindmarsh-Rose (HR) e um modelo baseado em condutâncias do tipo Hodgking-Huxley (HH). Finalmente, devido ao pobre desempenho do modelo HH também testamos uma versão do modelo HH com corrente I_h potencializada, que chamamos de HHH. Realizamos também experimentos com redes híbridas, conectando dois tipos de neurônios do gânglio estomogástrico de crustáceos aos neurônios modelo usando dynamic clamp, para confirmar os resultados obtidos nas simulações.

O modelo de CPG que utilizamos em nossas simulações é o mais simples possível, com apenas 2 neurônios, conforme mostrado na figura 8.1.

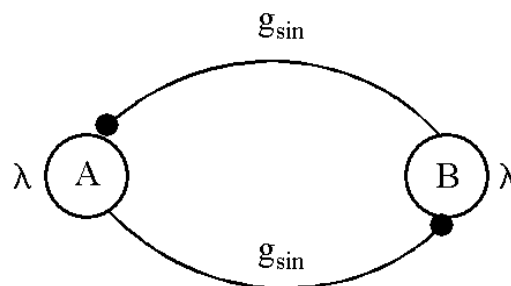
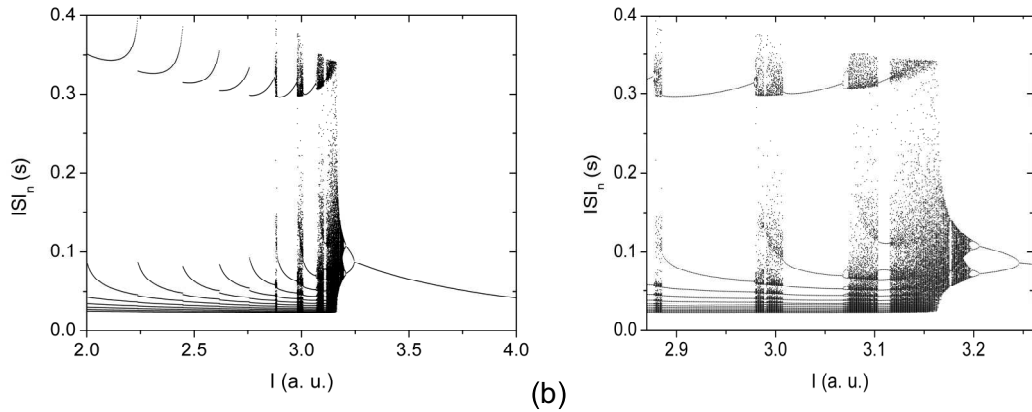
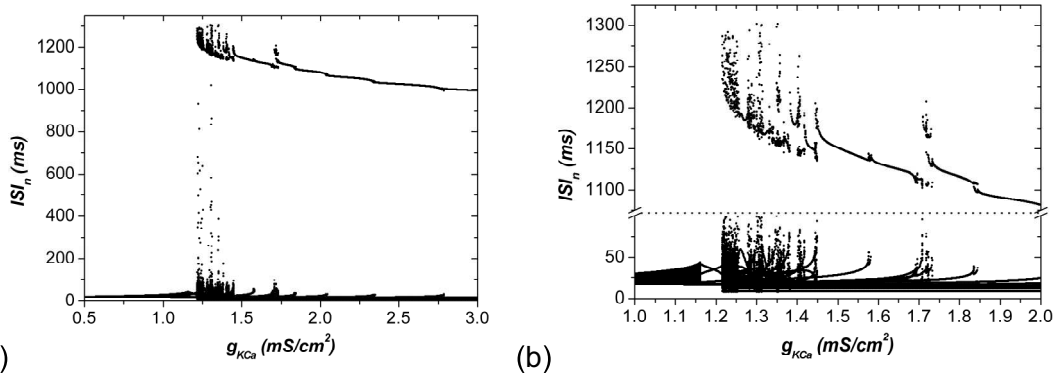


Figura 8.1 – O CPG mais simples: uma rede de inibição recíproca formada por dois neurônios acoplados por sinapses químicas inibitórias. Dois parâmetros são usados para controlar o comportamento da rede, um relacionado ao comportamento intrínseco dos neurônios e o outro que reflete a intensidade de acoplamento.

Observamos o comportamento de nossos CPGs simulados em função de dois parâmetros: a excitação dos neurônios (I) e a intensidade da inibição (g), parâmetros que podem ter sua alteração associada a atuação de neuromoduladores presentes no circuito biológico. O comportamento dinâmico dos neurônios isolados, em função de I , passa de periódico com salvas de potenciais de ação para caótico e por fim para periódico tônico, conforme mostramos nos diagramas de bifurcação das figuras 8.2, 8.3 e 8.4. Entretanto, para praticamente qualquer condição inicial e uma grande faixa de valores de I os neurônios, depois de conectados apresentam um comportamento periódico de salvas de potenciais de ação em antifase. Para analisar os dados foram construídos espaços de parâmetros onde representamos a frequência de salvas de potenciais de ação e o número de potenciais de ação por salva, respectivamente. Estes espaços de parâmetros são mostrados nas figuras 8.5 (HR), 8.6 (HH) e 8.7 (HHH).



(a) (b)
 Figura 8.2 - Diagrama de bifurcação dos ISIs em função do parâmetro I para o modelo HR. Em (b) mostramos em detalhe a região onde ocorrem sucessivas duplicações de período com a diminuição de I (rota de Feigenbaum para o caos).



(a) (b)
 Figura 8.3 - (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.

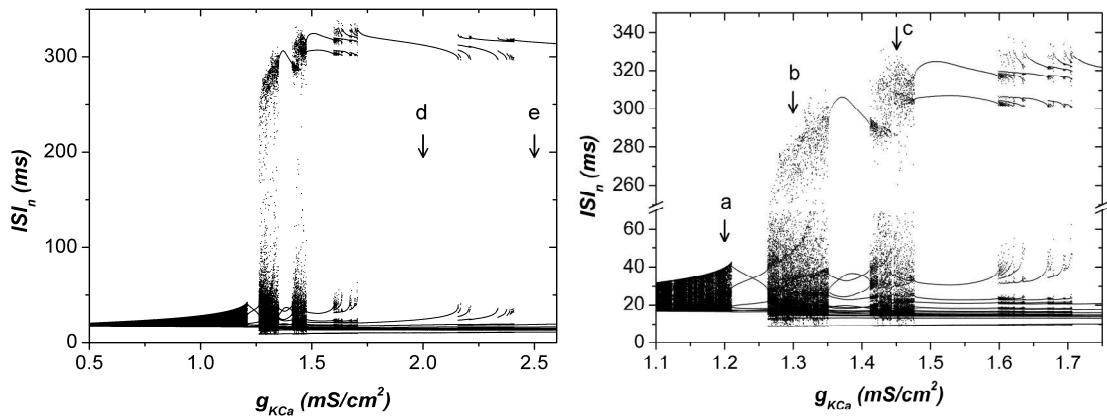


Figura 8.4 – A esquerda: diagrama de bifurcações para o modelo HHIH. À direita uma ampliação na região próxima da transição para comportamento tônico.

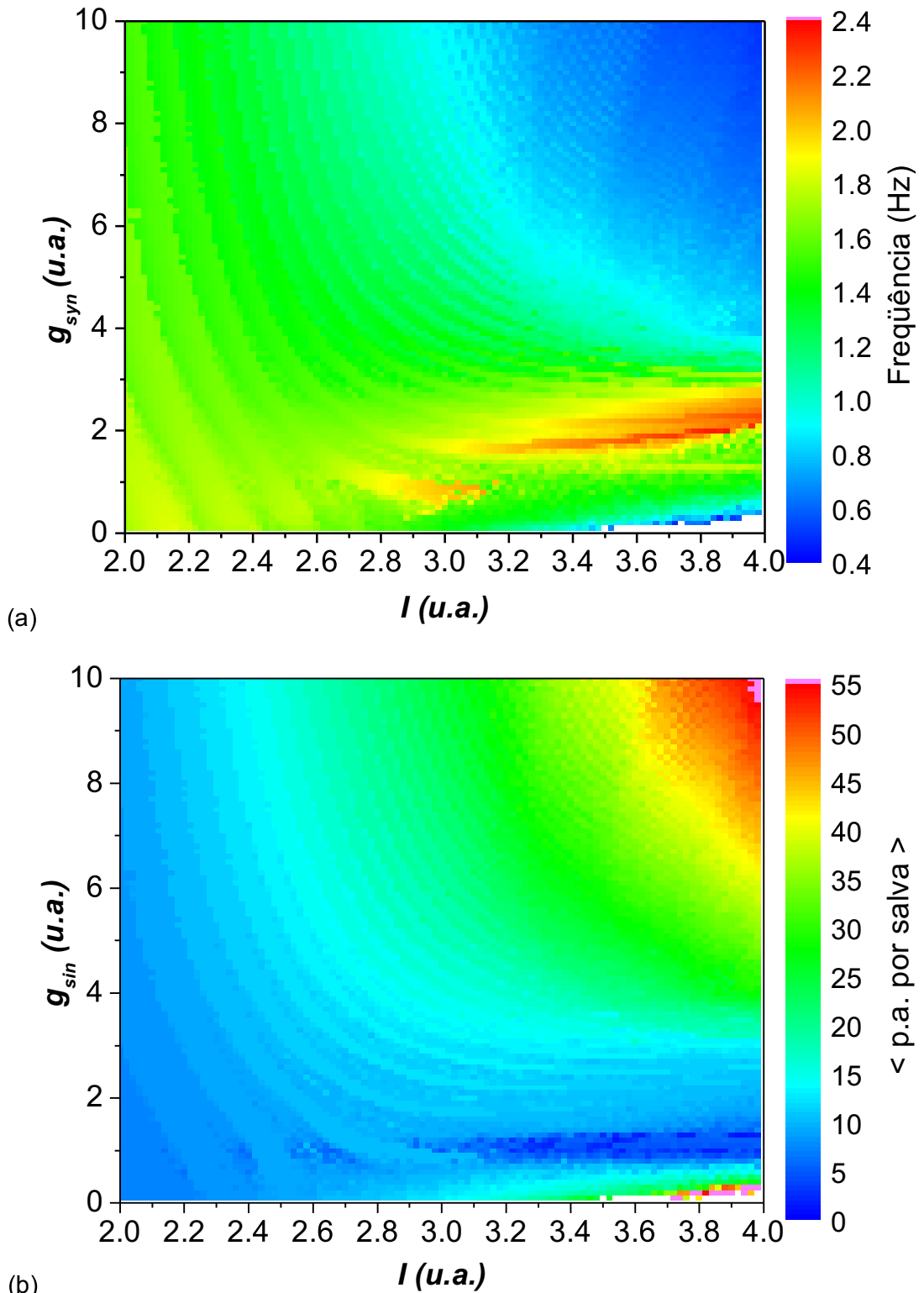
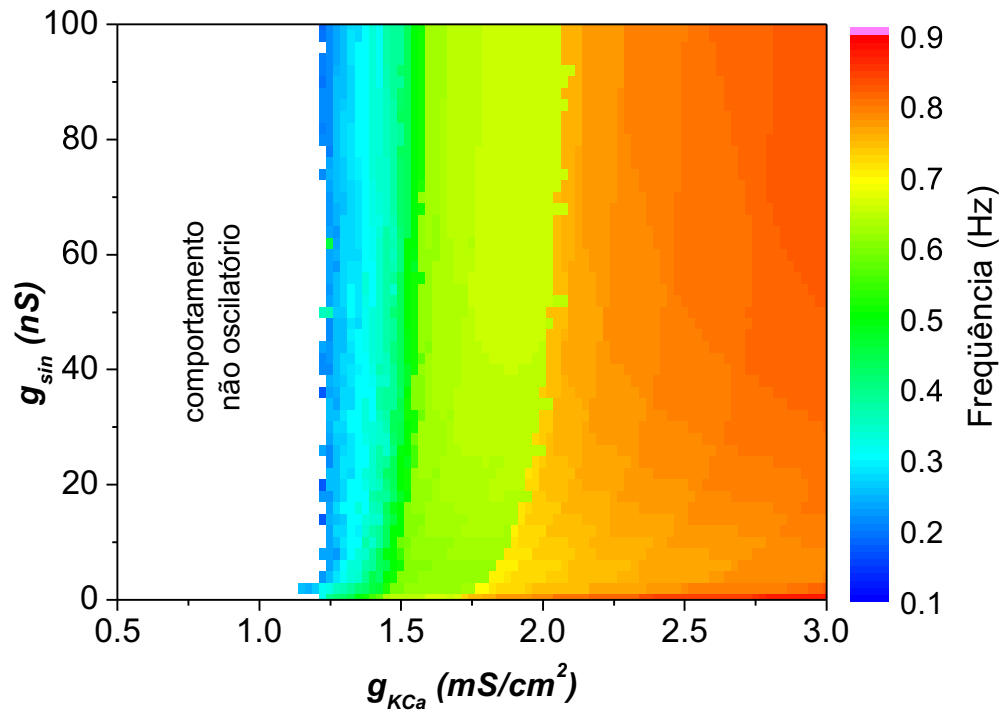
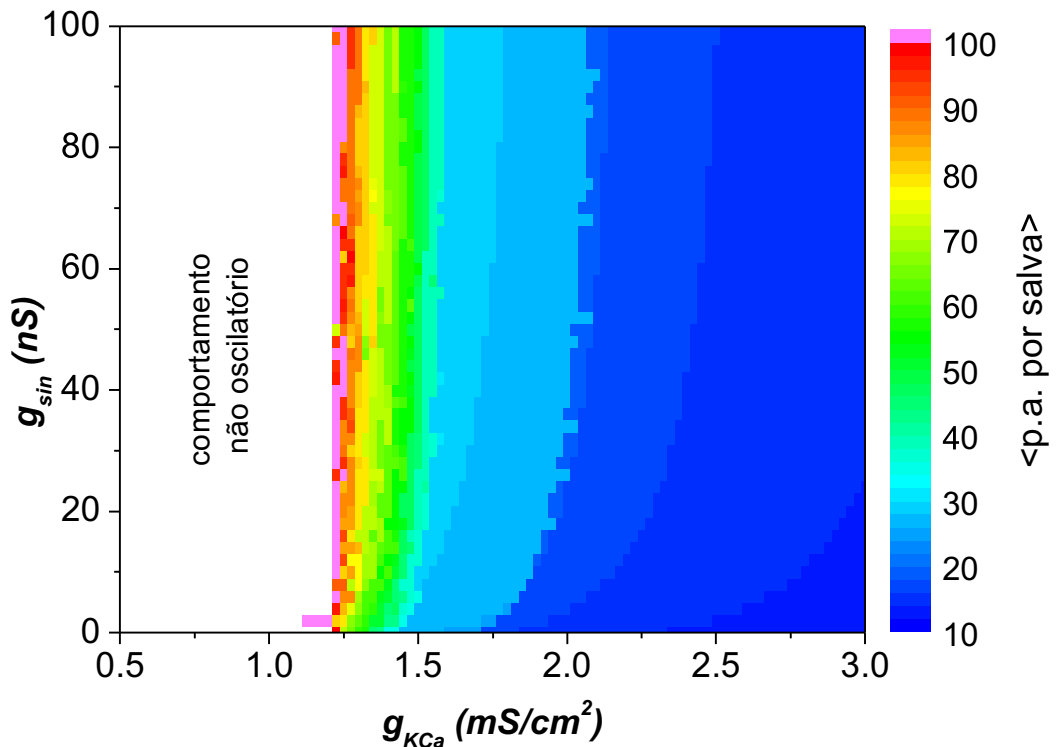


Figura 8.5 - Espaço de parâmetros (a) da frequência e (b) do número médio de potenciais de ação por salva para o modelo HR. Para a maior parte dos parâmetros, a dependência das duas grandezas é similar, significando que a diminuição da frequência de oscilação dos neurônios está associada a aumentos do 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)



(b)

Figura 8.6 - (a) Frequência 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 frequência é pouco modificada com a mudança da condutância sináptica. As grandezas exibidas nos dois gráficos têm comportamentos similares, mostrando que a variação da frequência está diretamente associada com mudanças no número de potenciais de ação nas rajadas.

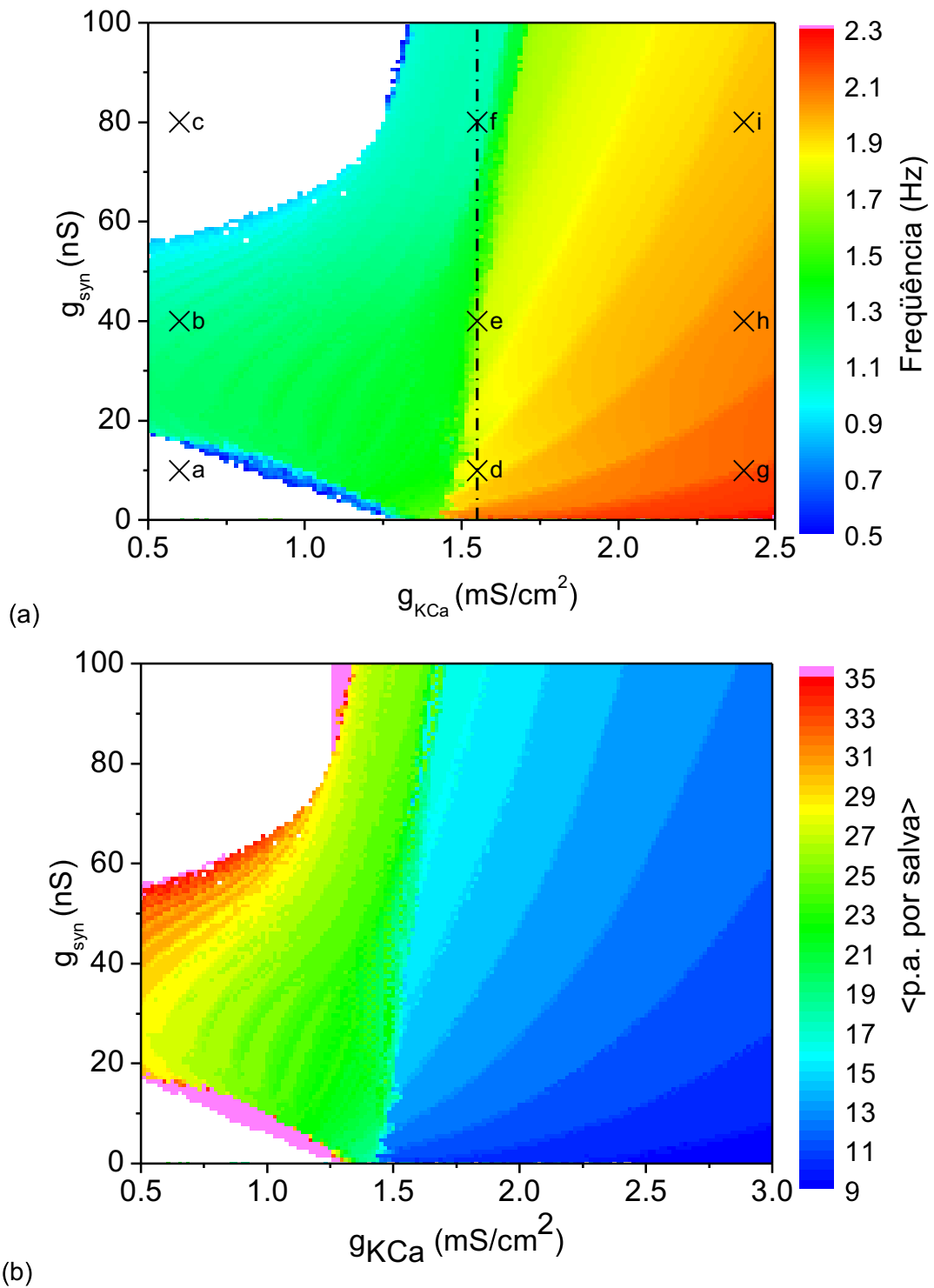


Figura 8.7 - (a) Espaço de parâmetros de frequência de rajadas para o modelo HHH. Podemos observar uma nova grande área colorida mostrando que o modelo apresenta oscilações em antifase para uma área muito maior do que sem a adição de lh. (b) Número médio de potenciais de ação por salva, que varia proporcionalmente à frequência de rajadas.

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.

O modelo HH, apesar de mais realista do ponto de vista eletrofisiológico, não apresenta um comportamento coletivo satisfatório em termos de flexibilidade e robustez e demonstra uma região em que a frequência de bursts aumenta com o aumento da intensidade da inibição, exatamente o contrário do que acontece com neurônios biológicos. Esta anomalia é corrigida quando potencializamos a corrente I_h (figura 8.7).

Para conferir estes resultados com os neurônios biológicos, realizamos diversos experimentos construindo CPG híbridos compostos por um neurônio biológico isolado sinapticamente do circuito original e conectado por dynamic clamp aos neurônios modelo HR e HH. Os resultados destes experimentos, mostrados nas figuras 8.8 e 8.9 confirmaram as deficiências do modelo HH. Já o modelo HR mostra novamente que seu comportamento caótico é que produz um CPG mais flexível quando alteramos o valor da condutância sináptica.

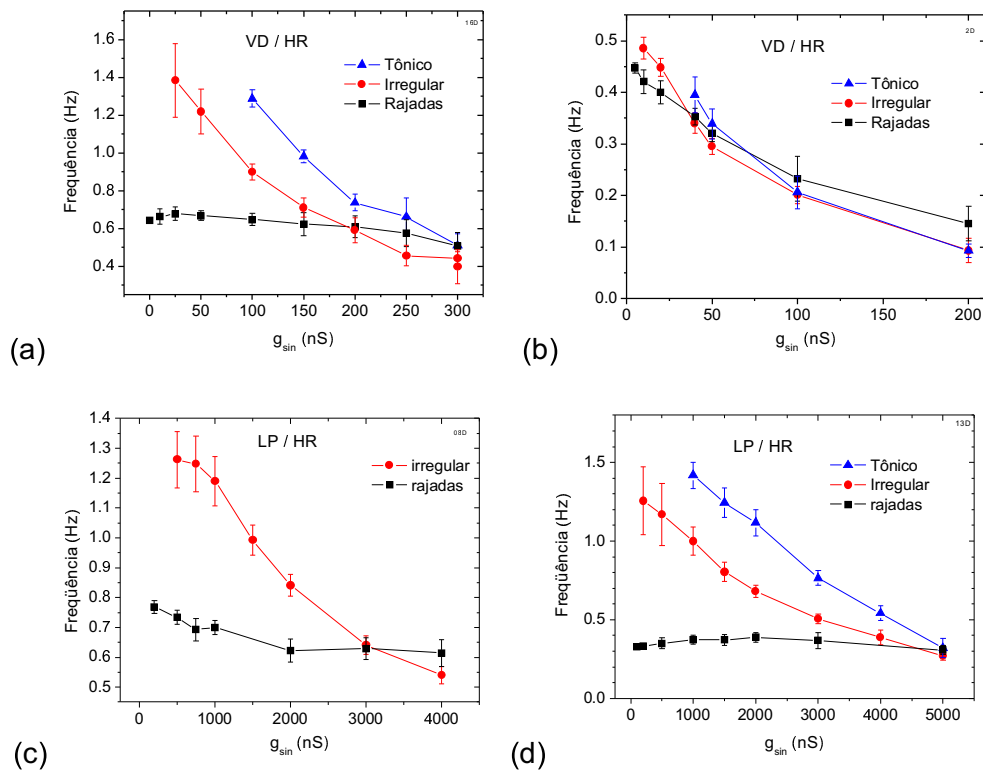


Figura 8.8 - Diversos dados da frequência de rajadas de um neurônio modelo HR conectado a um VD ou LP biológico. Quando os neurônios têm comportamento intrínseco em rajadas a mudança da frequência é sempre inferior às outras situações. A faixa de frequências que a rede alcança é maior quando os neurônios são tônicos do que quando eles apresentam comportamento caótico. No entanto, quando os neurônios são caóticos, a sincronização ocorre para condutâncias sinápticas menores.

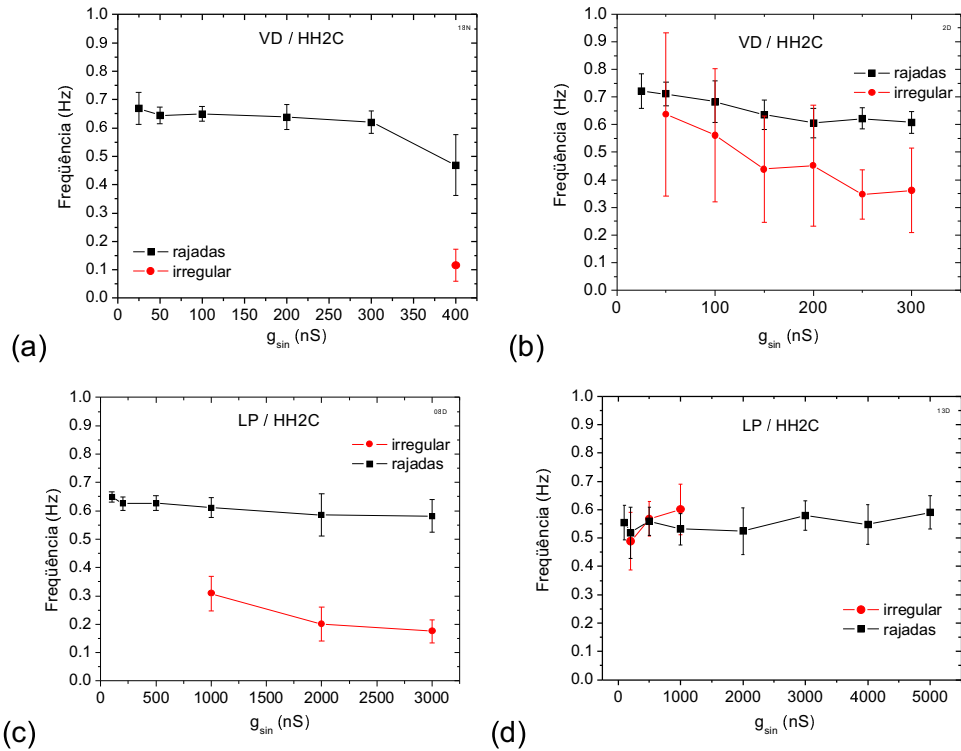


Figura 8.9 - Medidas da freqüência de rajadas de uma rede para quatro experimentos. Em cada gráfico identificamos o neurônio biológico que compõe a rede juntamente com o neurônio HH. A curva em preto (vermelho) mostra os dados com o comportamento intrínseco dos neurônios em rajadas periódicas (tônico). 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 nenhum padrão oscilatório.

Realizamos também simulações de um CPG mais complexo, capaz de gerar um padrão com 3 fases, semelhante ao padrão pilórico (figura 8.10).

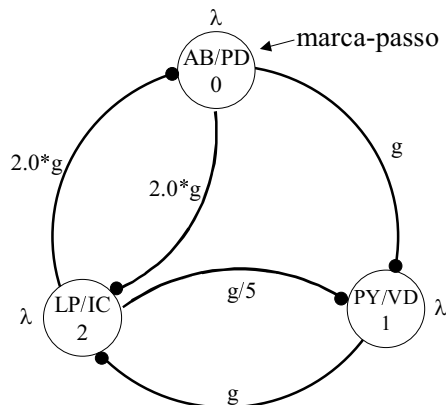
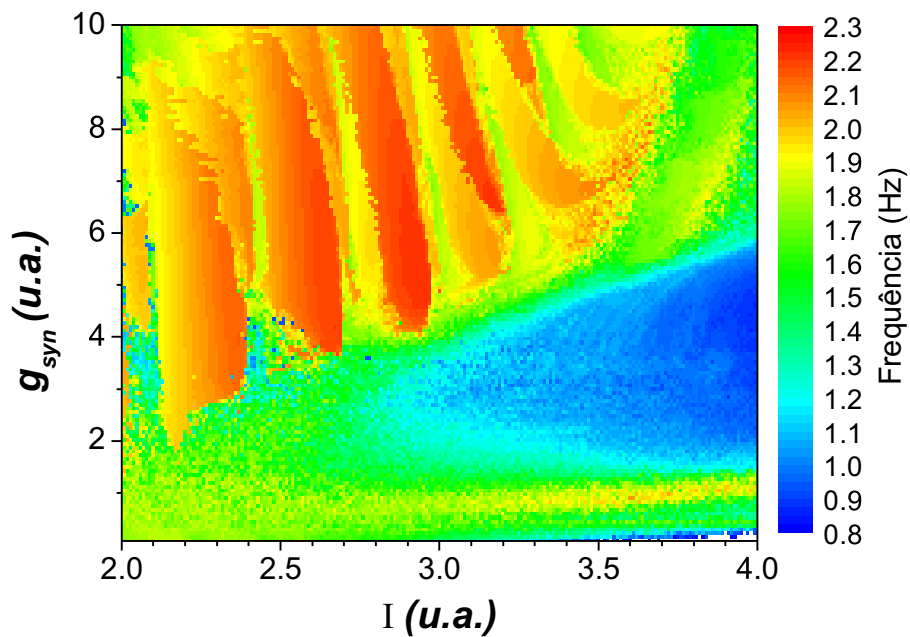
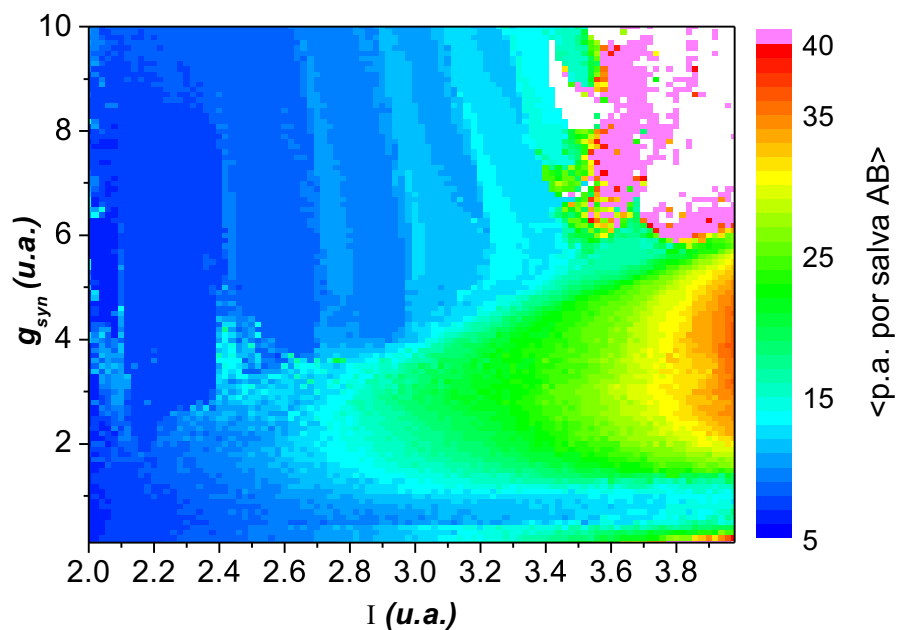


Figura 8.10 - Esquema de conexão sináptica do modelo de três fases para o circuito pilórico. Todas as sinapses são inibitórias e idênticas, com exceção das condutâncias sinápticas máximas, calculadas em função do parâmetro g . O parâmetro λ , que controla o comportamento dos neurônios também foi considerado igual para todos os neurônios.



(a)



(b)

Figura 8.11 - Espaços de parâmetros da frequência (a) e do número médio de potenciais de ação por salva (b) para uma rede com três neurônios HR.

Nos espaços de parâmetros da figura 8.11 observa-se que em torno de $I=3.15$ (região em que o neurônio isolado é caótico) há uma grande aproximação entre a língua de Arnold de alta frequência e a região de baixa frequência, de modo que uma alteração de 2X na intensidade da sinapse é suficiente para alterar a frequência em quase 3X.

Todos os resultados apresentados nesta seção fazem parte da tese de doutoramento do estudante Marcelo Reyes (Reyes, 2005, *ANEXO 53*) e dois trabalhos encontram-se em fase de redação.

9. Aparecimento de comportamento caótico em modelos estocásticos da atividade de neurônios isolados

Desde o trabalho pioneiro que introduziu as técnicas de *voltage-clamp* e a modelagem matemática da atividade elétrica do axônio gigante da lula (Hodgkin & Huxley, 1952), modelos determinísticos do comportamento das condutâncias iônicas tem sido adotados por muitos neurocientistas como um paradigma do comportamento elétrico macroscópico da membrana dos neurônios. A principal razão do sucesso destes modelos é a capacidade que eles tem de colocar sob um formalismo matemático rigoroso a maior parte do comportamento elétrico dos neurônios, incluindo a geração de potenciais de ação. Como a maior parte dos valores dos parâmetros do modelo pode ser inferida quase que diretamente de experimentos do tipo *voltage-clamp*, onde a contribuição de cada população iônica para a corrente total pode ser separada e estudada em detalhe, os modelos determinísticos tornaram-se muito populares entre os experimentais (Kandel *et al.*, 1991; Dayan & Abbott, 2001).

Entretanto, sabe-se que o comportamento dinâmico intrínseco do potencial de membrana da maioria dos neurônios biológicos é bem diferente de determinístico. Experimentos em que neurônios do cortex de mamíferos foram isolados e um padrão artificialmente gerado foi apresentado repetidamente como entrada (Mainen & Sejnowski, 1995) mostraram que a confiabilidade da precisão temporal dos potenciais de ação gerados depende de propriedades estatísticas do sinal gerado, não concordando com as previsões determinísticas.

Até mesmo em circuitos neurais especializados em produzir padrões motores periódicos e estáveis para controlar a atividade repetitiva de músculos, como o bem estudado CPG do gânglio estomatogástrico de crustáceos (STG) (Mulloney & Selverston, 1974; Selverston & Moulins, 1986), a maioria dos neurônios motores do circuito apresentam um comportamento irregular e bastante variável de produção de potenciais de ação em trens ou *bursts* quando são isolados sinapticamente dos outros neurônios do circuito (Rabinovich *et al.*, 1997; Elson *et al.*, 1999; Selverston *et al.*, 2000).

Cada vez que um destes neurônios é isolado do CPG pilórico ele revela um repertório similar de comportamentos irregulares, mas sabe-se que existem pequenas diferenças nas condutâncias da membrana de neurônio para neurônio e de animal para animal. Isso matematicamente significa que, se for possível escrever equações que modelem o comportamento experimental, os parâmetros destas equações não poderão nunca ser especificados exatamente. Mesmo assim, um comportamento similar é esperado quando os parâmetros sofrem pequenas variações. Esta é exatamente a idéia de estabilidade estrutural da teoria de sistemas dinâmicos (Abraham & Shaw, 1992).

Deste modo, o comportamento irregular, que se mostrou relacionado a propriedades não-lineares e caóticas dos neurônios (Rabinovich *et al.*, 1997; Falcke *et al.*, 2000), é estruturalmente estável em um espaço de parâmetros de alta dimensão, onde os neurônios estão sujeitos a pequenas flutuações não apenas em suas propriedades intrínsecas, mas também em parâmetros externos importantes como a temperatura da preparação, as concentrações iônicas da solução fisiológica, etc.

A estabilidade estrutural do comportamento irregular é um obstáculo sério ao desenvolvimento de modelos determinísticos baseados em condutâncias do tipo Hodgkin-Huxley (HH). No modelo original HH da geração de potenciais de ação (4 equações diferenciais) pelo axônio foi encontrado apenas comportamento caótico estruturalmente instável, já que este é confinado em um volume ínfimo do espaço de

parâmetros (Guckenheimer & Oliva, 2002). Em modelos mais realistas de um neurônio, onde mais de uma dezena de equações não-lineares são acopladas, pode-se intuitivamente esperar que a maior complexidade levaria a um aumento das regiões do espaço de parâmetros onde ocorrem comportamentos irregulares e estes se tornassem estruturalmente estáveis. Surpreendentemente, não é isso que acontece.

Recentemente, um modelo determinístico do tipo HH para neurônios do STG em cultura (Turrigiano *et al.*, 1995), que é capaz de reproduzir com sucesso vários modos de funcionamento dos neurônios biológicos, foi estudado em bastante detalhe (Prinz *et al.*, 2003b) e uma base de dados com aproximadamente 1,7 milhões de neurônios diferentes (cada um correspondendo a um conjunto particular de valores de condutâncias em um espaço de parâmetros com 8 dimensões) foi construída para caracterizar os diferentes tipos de atividade dinâmica que o modelo pode reproduzir. Em toda a base de dados apenas 0,1% dos neurônios correspondem a comportamentos verdadeiramente irregulares (não relacionados a instabilidades nas proximidades de bifurcações de adição de período em um comportamento periódico). Além disso, a pequena porcentagem de comportamentos irregulares não se encontra condensada em uma região específica do espaço de parâmetros, mas bastante dispersa (Prinz *et al.*, 2004), o que sugere fortemente que o comportamento irregular não é estruturalmente estável neste modelo.

Comportamento complexo ou caótico (Abarbanel, 1996) estruturalmente estável foi encontrado apenas em alguns modelos determinísticos (Komendantov & Kononenko, 1996; Falcke *et al.*, 2000) que incluem um modelo não linear da troca de cálcio entre depósitos no retículo endoplasmático e o citosol. A característica mais importante destes modelos é que a modulação da $[Ca^{+2}]$ é o principal mecanismo usado para regular muitos processos celulares (Ikeda, 2004). Entretanto, de acordo com estes modelos a célula deveria apresentar oscilações lentas macroscópicas dos níveis de cálcio citosólico. Tais oscilações da $[Ca^{+2}]$ foram observadas experimentalmente em alguns neurônios de vertebrados (Parri & Crunelli, 2001; Zhang *et al.*, 2003), mas nunca foram encontradas em neurônios do STG (Levi *et al.*, 2003).

Baseados no sucesso de modelos estocásticos da dinâmica axonal (Schneidman *et al.*, 1998) que reproduzem o comportamento experimental (Mainen & Sejnowski, 1995) ao resgatar as características probabilísticas dos canais iônicos (Hille, 2001; Levitan & Kaczmarek, 1997; Skaugen & Walloe, 1979; White *et al.*, 1998; White *et al.*, 2000) propusemos recentemente um modelo estocástico para os neurônios do STG (Carelli *et al.*, 2005, *ANEXO 17*). Nosso modelo é uma tradução do modelo HH usado por Prinz *et al.* e baseia-se numa descrição Markoviana (Destexhe *et al.*, 1994) dos estados microscópicos que os canais de cada tipo iônico podem assumir. A tradução foi feita cuidadosamente para não alterar ou incluir nenhuma dinâmica que não estivesse presente no modelo determinístico original. Desse modo, pudemos além de comparar nossos resultados com o comportamento de neurônios reais do STG, comparar diretamente com os resultados do modelo determinístico original quando usamos os mesmos valores de parâmetros (condutância máxima dos diversos tipos iônicos), e toda a dinâmica não periódica pode ser atribuída à natureza estocástica considerada apenas no nosso modelo.

O modelo HH estocástico que desenvolvemos foi capaz de reproduzir as irregularidades encontradas em neurônios biológicos (Selverston *et al.*, 2000; Falcke *et al.*, 2000; Szücs *et al.*, 2003), conforme mostrado na figura 9.1, e apresentou comportamento irregular estruturalmente estável para um volume grande do espaço de parâmetros, o que era de se esperar ao acrescentarmos uma fonte de “ruído”. O que

não era esperado é que as séries temporais irregulares produzidas pelo modelo estocástico, quando analisadas usando técnicas da teoria de sistemas dinâmicos não-lineares e caos (Abarbanel, 1996; Hegger *et al.*, 1999), apresentassem atratores dinâmicos de baixa dimensão e expoentes de Lyapunov positivos, da mesma maneira que acontece com as séries de dados experimentais. Ou seja, o modelo estocástico parece recuperar as irregularidades encontradas nos neurônios biológicos, produzindo eventos globalmente caóticos a partir de uma descrição dinâmica local estocástica que foi diretamente traduzida de um modelo determinístico que não apresenta nenhum comportamento caótico estruturalmente estável.

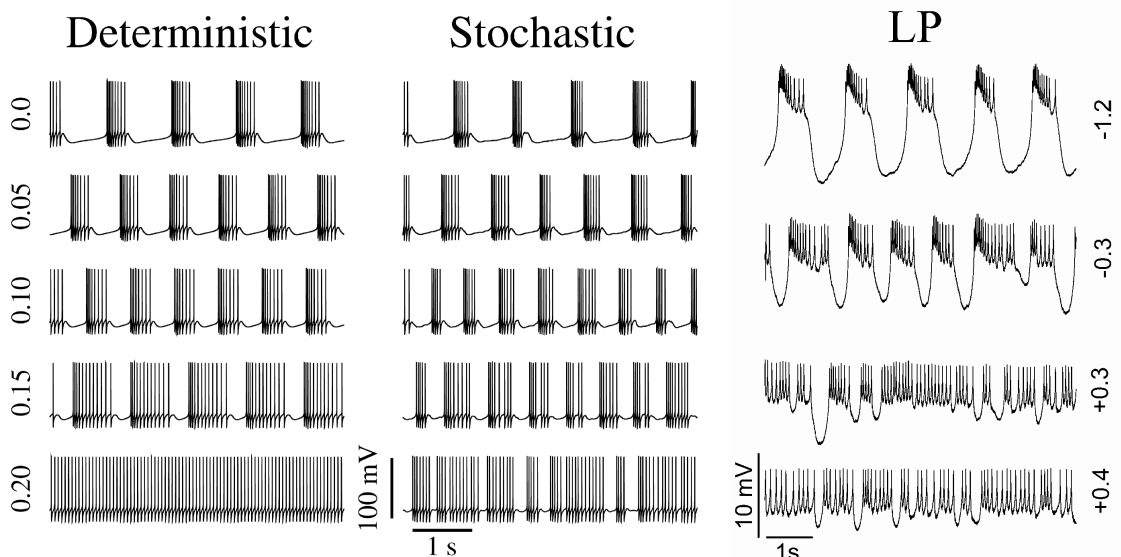


Figura 9.1 – Exemplo do comportamento dos dois modelos e do neurônio biológico LP quando uma corrente DC (legendas laterais) é injetada nas células. No modelo determinístico o número de potenciais de ação/burst aumenta com a corrente, bursts periódicos cada vez mais longos são produzidos até que um regime de disparo tônico (sem interrupções) se estabelece para $I=0.20$. No modelo estocástico, o número médio de potenciais de ação / burst também aumenta mas há bursts curtos misturados com bursts longos, como acontece com o LP. Extraída de Carelli *et al.*, 2005.

Na figura 9.2 mostramos uma superposição de trens de potenciais de ação para uma série temporal de um neurônio lateral pilórico (LP) biológico (direita). Na mesma figura também estão os resultados obtidos aplicando a mesma técnica às séries temporais de um modelo tipo HH determinístico (esquerda) e ao modelo HH estocástico (centro).



Figura 9.2 – O primeiro potencial de ação de cada burst foi usado para alinhar e sobrepor diferentes bursts da atividade elétrica ($N=50$) e simular condições iniciais similares para os dois modelos. Todos os potenciais de ação e bursts do modelo determinístico (esquerda) são precisamente repetidos e o padrão obtido é uma curva fina. A superposição de 10 bursts do neurônio biológico LP (direita) mostra um comportamento diferente: a precisão diminui a cada novo potencial de ação e o final do burst é bastante irregular como ocorre em um sistema dinâmico com sensibilidade às condições iniciais. O modelo estocástico (centro) imita muito bem a crescente diminuição da precisão dos potenciais de ação que ocorre no neurônio biológico. Extraída de Carelli *et al.*, 2005.

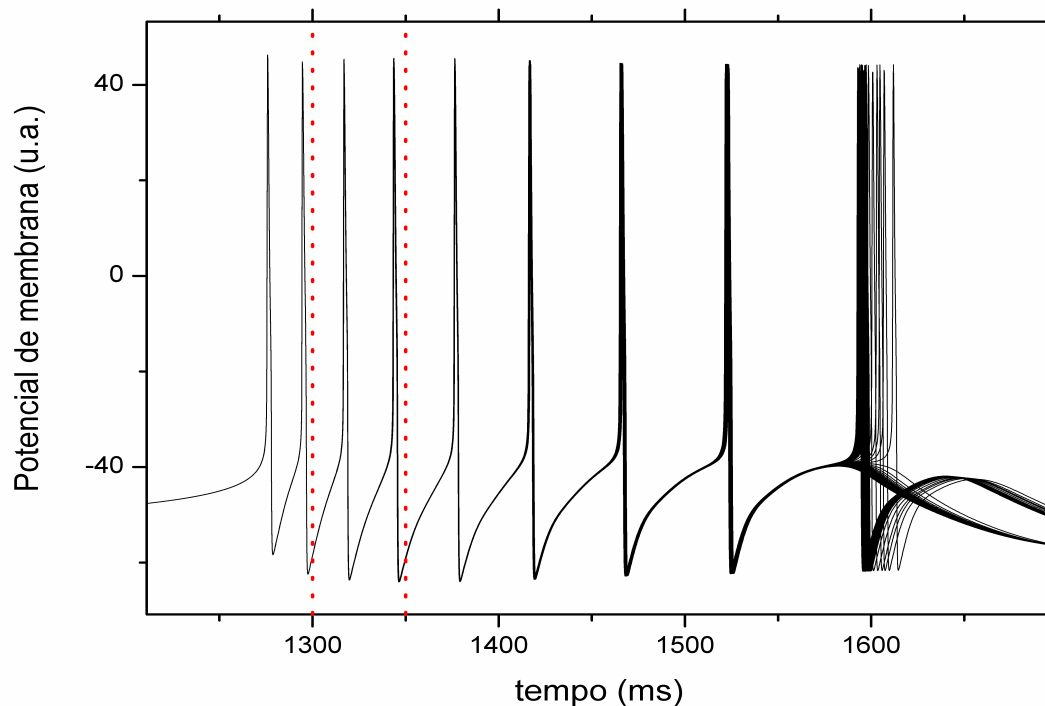


Figura 9.3 – Superposição de 50 bursts do modelo determinístico perturbado. A perturbação consiste em incrementar o valor da variável de ativação $m_{K[Ca]}$ de 0.01 em um instante aleatório entre 1300 e 1350ms (linhas verticais tracejadas). Não se observa nenhum efeito em V_m até ~ 1450 ms quando os bursts começam a se diferenciar lentamente até que em ~ 1600 ms o último potencial de ação do burst pode ou não ocorrer. Após cada perturbação desprezam-se 3 bursts para que o modelo volte ao comportamento periódico estacionário antes de se aplicar nova perturbação.

Como a única diferença entre o modelo estocástico e o determinístico é o caráter probabilístico atribuído ao funcionamento dos canais iônicos, nossa hipótese é que a sensibilidade às condições iniciais já deveria estar presente no modelo determinístico em uma vizinhança próxima da órbita periódica que só passa a ser visitada pelo sistema dinâmico devido às perturbações introduzidas pelo “ruído” dos canais iônicos. Para testar esta hipótese perturbamos uma das variáveis dinâmicas do modelo determinístico periódico em um instante escolhido aleatoriamente dentro de uma janela de tempo após o início de um burst. A variável perturbada é a ativação da condutância de potássio dependente de cálcio $m_{K[Ca]}$ e a perturbação consiste em aumentar o valor de $m_{K[Ca]}$ de 0.01. Os bursts perturbados são superpostos usando o primeiro potencial de ação e desprezam-se 3 bursts para o modelo determinístico voltar ao comportamento estacionário antes de uma nova perturbação ser aplicada. O resultado obtido é mostrado nas figuras 9.3 e 9.4.

Logo após a perturbação praticamente nenhum efeito é observado no comportamento do potencial de membrana (figura 9.3), apenas após algum tempo é que se observa uma divergência de comportamento entre os diferentes bursts. A dinâmica da variável $m_{K[Ca]}$ (figura 9.4) é ainda mais interessante, a amplitude da perturbação diminui rapidamente no início volta a crescer no final do burst.

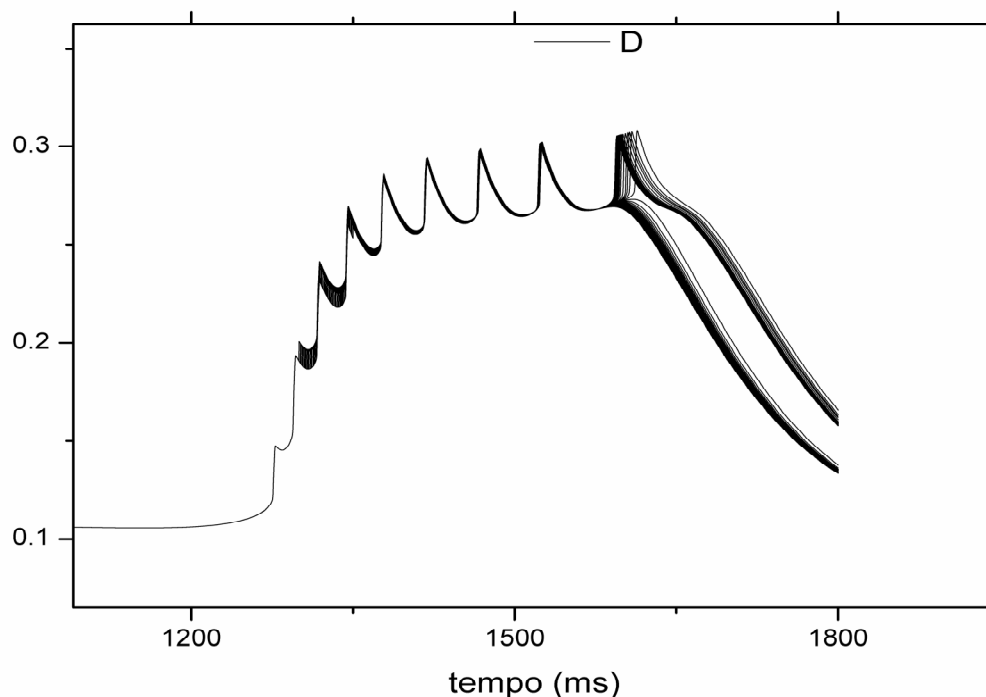


Figura 9.4 – Superposição do comportamento da variável de ativação $m_{K[Ca]}$ durante 50 bursts do modelo determinístico perturbado. A variável é perturbada (incrementada de 0.01) em um instante aleatório entre 1300ms e 1350ms. Observa-se que inicialmente a perturbação diminui de amplitude e depois volta a crescer no final do burst. Após cada perturbação desprezam-se 3 bursts para que o modelo volte ao comportamento periódico estacionário antes de se aplicar nova perturbação.

Estes resultados indicam que a sensibilidade às condições iniciais revelada pelo modelo estocástico já estava presente no modelo determinístico e este fato pode ser de grande importância para as características de confiabilidade e flexibilidade que os CPGs biológicos devem possuir (Selverston *et al.*, 2000).

10. Análise da atividade em bursts dos neurônios do STG e a Teoria da Informação

Como o comportamento dinâmico dos neurônios do STG é composto por bursts de spikes, as séries de intervalos entre spikes (ISIs) apresentam seqüências de intervalos curtos de tempo (correspondentes aos ISI entre os spikes de um mesmo burst) separadas por intervalos longos (correspondentes às hiperpolarizações da célula). Se plotarmos o mapa de retorno dos ISIs observa-se algo parecido com três pontos, correspondentes as combinações (curto, curto), (curto, longo) e (longo, curto). O valor médio correspondente ao intervalo longo (hiperpolarização) é muito maior que o valor médio dos intervalos curtos (ISIs dentro de um burst), qualquer estrutura contida nos intervalos curtos é comprimida na origem do mapa, como mostramos na Figura 10.1 para um neurônio VD. Quando ampliamos a escala excluindo os pontos que possuem uma das coordenadas correspondentes ao intervalo de hiperpolarização observamos uma estrutura coerente e precisa como mostrado na figura 10.2 para o neurônio PD. O mapeamento apresenta clusters (regiões com grande densidade de pontos) muito bem definidos. A posição dos clusters varia de um tipo de neurônio para outro, mas é muito similar dentro em uma mesma classe de neurônios.

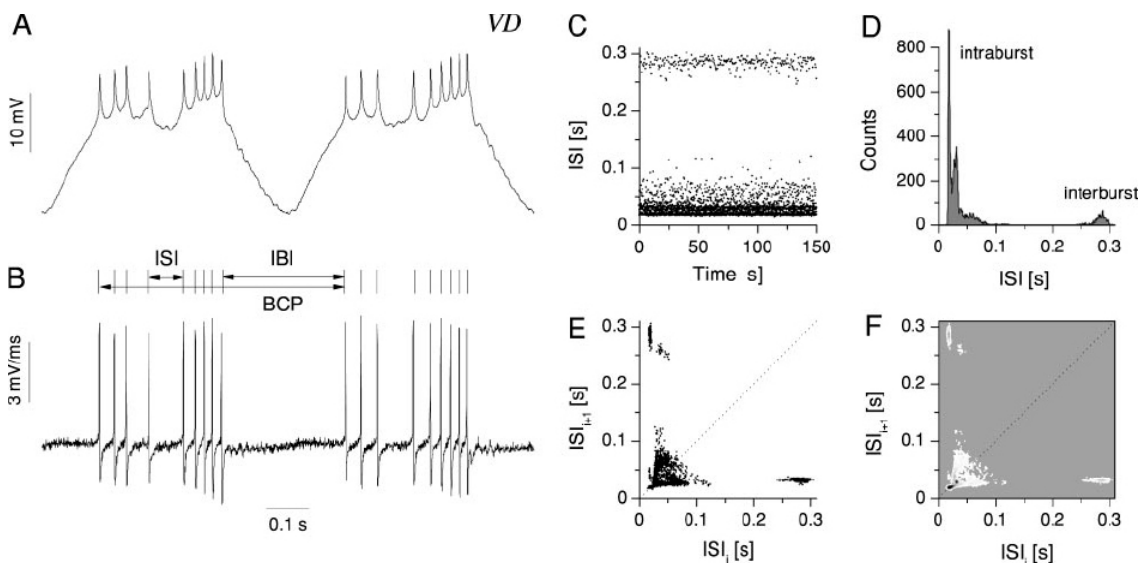


Figura 10.1 – Série temporal de um neurônio VD (A). Os spikes são detectados usando a derivada do potencial de membrana (B). Observam-se dois picos bem distintos na distribuição de ISIs (C,D) que levam a mapas de retorno que apresentam 3 regiões densas (E,F). Extraída de Szücs *et al.*, 2003.

Quando introduzimos PTX na solução fisiológica, bloqueando a sinapse glutamatérgica inibidora proveniente do LP, observamos que os clusters presentes nos mapas do PD desapareciam e os pontos passavam a se distribuir de modo mais difuso. O mesmo acontecia quando hiperpolarizamos LP, ou seja, parecia existir uma dependência do padrão apresentado pelos ISI do PD com relação à aplicação de pulsos inibidores durante sua hiperpolarização, conforme mostrado na figura 10.2.

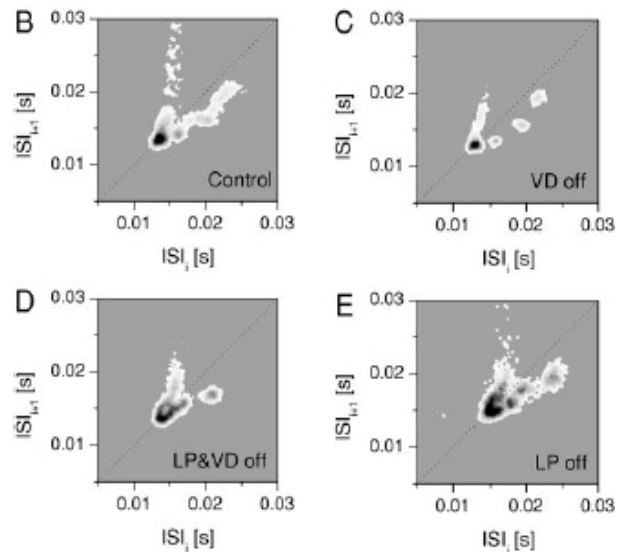
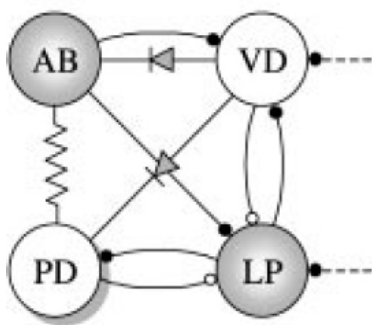


Figura 10.2 – À esquerda o circuito pilórico simplificado. Em B mostramos o detalhe da distribuição de pontos próximos da origem do mapa de retorno de ISIs do neurônio PD em condições normais de conectividade. Em C, D, e E é mostrado o mesmo mapa, porém quando os neurônios VD, LP+VD e LP são hiperpolarizados, respectivamente. Observa-se que um mesmo neurônio PD apresenta um padrão diferente de ISIs para cada caso. Extraída de Szücs *et al.*, 2003.

Para verificar esta hipótese preparamos um experimento em que utilizamos PTX para bloquear a sinapse do LP e usamos um programa de computador que simula o comportamento do neurônio LP, detectando a hiperpolarização do PD e produzindo uma corrente pós-sináptica inibidora (IPSC) através de dynamic clamp que é injetada na célula biológica. O atraso (delay) entre o início do trem de pulsos e a detecção da hiperpolarização é ajustável e simula uma alteração na fase do burst das células (Figura 10.3). O número de spikes do LP artificial e o padrão de ISI (ISI1, ISI2, ISI3), mostrados na Figura 10.3, também são ajustáveis.

Verificamos que o padrão apresentado no mapa de ISIs do PD depende tanto da fase em que o burst artificial é gerado como do padrão contido nos ISIs do burst artificial (Figura 10.4), revelando uma capacidade de detectar padrões nos ISI provenientes de sinapses da qual não se suspeitava, uma vez que estas células são neurônios motores e a precisão do padrão dos ISIs dentro de um burst não é importante para a geração do padrão motor. Estes resultados (Szücs *et al.*, 2003, *ANEXO 20*) deram início aos experimentos em que usamos teoria da informação para investigar como os neurônios utilizam seus ISIs para codificar o comportamento dos outros neurônios do circuito.

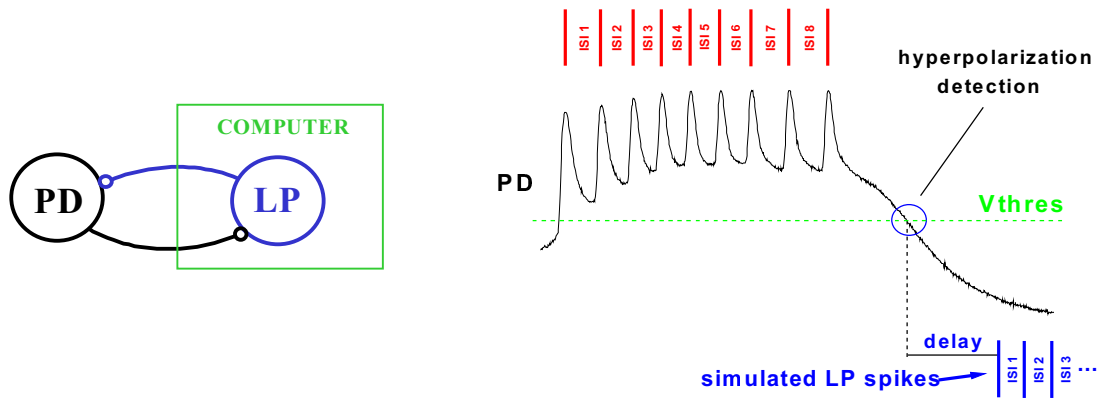


Figura 10.3 – Substituindo o LP biológico por um gerador de spikes artificial. O LP biológico é hiperpolarizado e um computador com um dynamic clamp modificado é usado para injetar através de uma sinápsis química artificial um padrão de pulsos inibidores. O computador detecta o momento da hiperpolarização do PD e após um intervalo de tempo escolhido (delay) produz o padrão de ISIs previamente estabelecido.

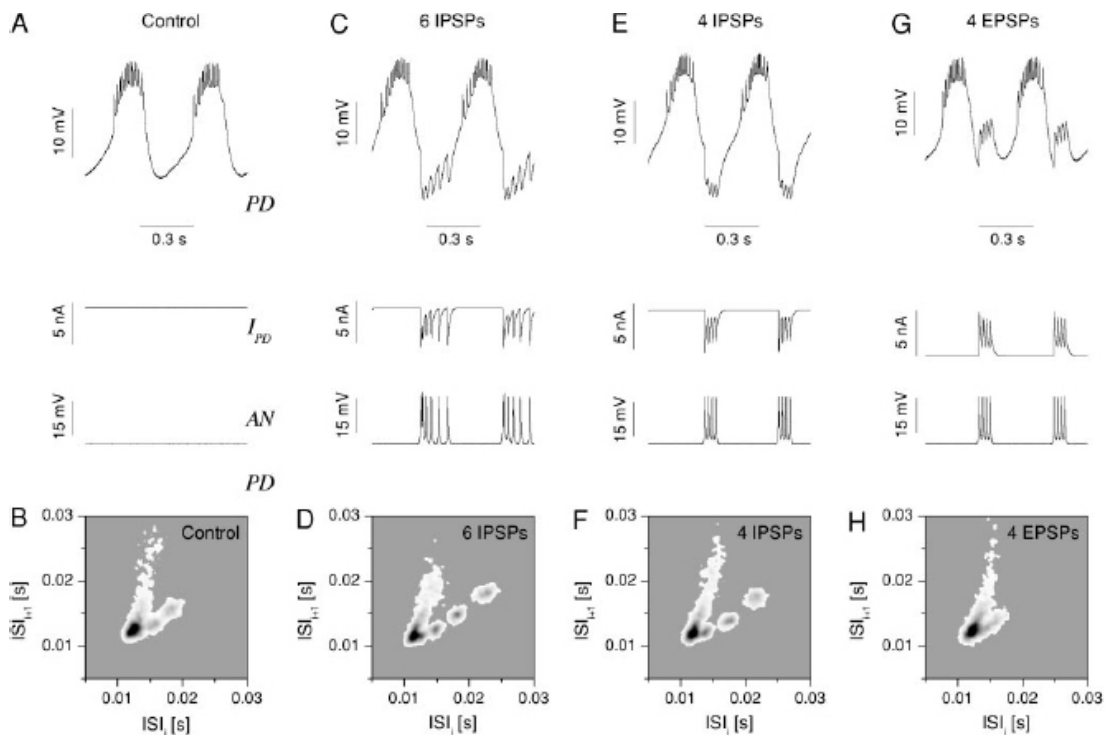


Figura 10.4 – Dependência do padrão do mapa de retorno dos ISIs do PD em função do padrão usado no LP artificial. Cada coluna corresponde a um padrão diferente programado no neurônio artificial. Na parte superior encontram-se as séries do potencial de membrana durante dois bursts do PD. No meio da figura encontram-se as séries temporais da corrente injetada no PD através do dynamic clamp. Na parte inferior encontram-se os mapas de retorno obtidos em cada caso. Extraída de Szücs et al., 2003.

Para estudar esta capacidade dos neurônios do STG reagir de maneira diferente a diferentes estímulos, estamos aplicando atualmente a teoria da informação (Shannon, 1948; Borst & Theunissen, 1999, Rabinovich *et al.*, 2002).

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

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

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

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

que também pode ser expressa por

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

onde $H(R|S)$ é a entropia condicional da resposta em função do estímulo. A Informação Mútua Média é sempre maior ou igual a zero.

Na figura 10.5 mostramos como usamos as seqüências de potenciais de ação em bursts de atividade em pares de sinais para produzir os pares (s,r).

Séries temporais simultâneas dos dois sinais são gravadas e a posição dos potenciais de ação são detectadas usando técnicas de derivada máxima implementadas em um programa em C++ que faz também o cálculo da informação mútua média.

Como a teoria da informação nada afirma sobre a direção do fluxo de informação, em nosso caso, sempre que possível preferimos utilizar eventos que ocorrem em uma seqüência causal, ou seja, entre os neurônios LP e PD calculamos a informação que um burst do LP transmitiu para o próximo burst do PD e vice-versa. Assim a direção de propagação da informação emerge naturalmente das relações de causalidade.

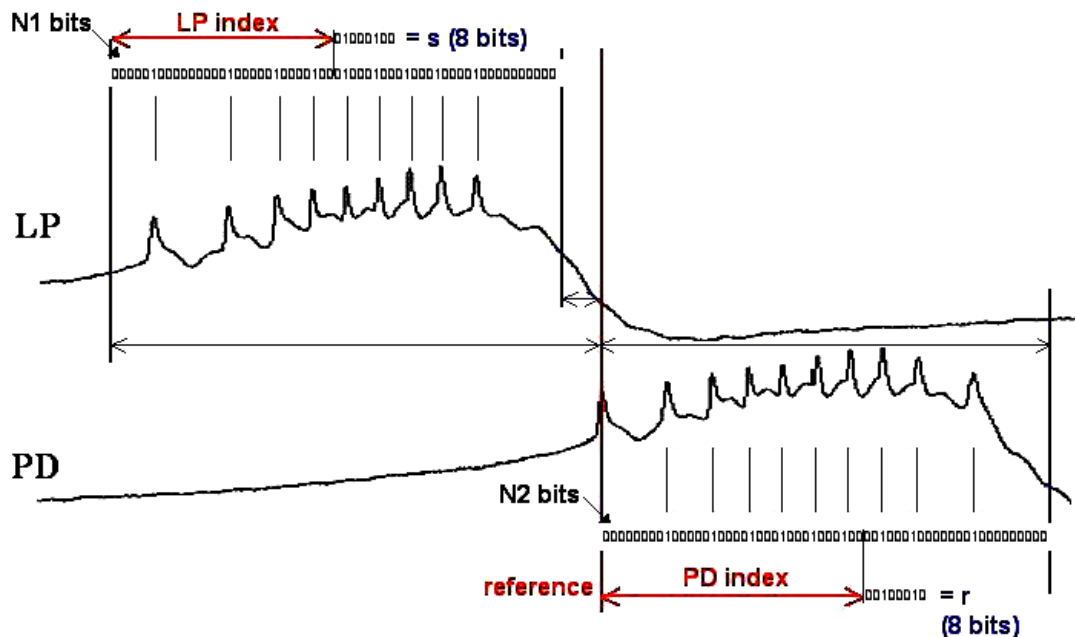


FIGURA 10.5 Exemplo de um pequeno trecho das séries temporais obtidas de dois neurônios biológicos e o esquema utilizado para codificar a posição dos potenciais de ação. O primeiro potencial de ação de cada burst do PD é usado como referência de tempo para cada par de bursts dos neurônios. Janelas que correspondem à máxima largura que um burst de cada neurônio pode ocupar são escolhidas e subdivididas em um grande número de intervalos que correspondem aos bits do código.

O primeiro potencial de ação de cada burst do PD é usado como referência de tempo para a ocorrência dos outros potenciais de ação do PD e para os potenciais do LP. Procura-se em todos os pares de bursts pelas menores janelas temporais que sejam capazes de englobar todos os potenciais de ação dos bursts do LP e do PD. Estas janelas são subdivididas em $N1$ e $N2$ intervalos respectivamente. A presença de um potencial de ação em um intervalo implica na atribuição de um bit 1 ao intervalo; caso contrário, um bit 0 é atribuído.

Assim, cada par de bursts é transformado em um par de strings com $N1$ e $N2$ bits ($N1$ e $N2$ são tipicamente ~ 16 a 32 bits). Como a informação mútua média apenas fornece o número de bits de informação entre dois sinais e este número depende do código escolhido, do tamanho da janela e outras escolhas arbitrárias, decidimos calcular a informação mútua média entre partes distintas de cada burst e comparar a informação mútua média obtida para diferentes posições escolhidas dentro das strings de bits totais. Usamos dois ponteiros (LP_{index} , PD_{index}) para escolher dentro das strings as posições das quais extraímos os 8 bits que constituirão os pares $(s(LP_{index}), r(PD_{index}))$ para cada par de bursts. Finalmente, a informação mútua média é calculada usando todos os pares (s, r) obtidos para uma mesma posição (LP_{index} , PD_{index}). Um gráfico colorido bidimensional é usado para mostrar a informação mútua média em função das posições LP_{index} e PD_{index} .

Para verificar a significância estatística de nossos resultados do cálculo da informação mútua média utilizamos o método dos surrogates (Theiler *et al.*, 1992), que consiste em embaralhar aleatoriamente os estímulos do conjunto de pares (s,r), quebrando a relação de causalidade, e recalculando a informação mútua média. Deste modo podemos comparar o resultado original com um o obtido de pares (s,r) escolhidos aleatoriamente mas com cada conjunto (s ou r) idêntico ao conjunto original. Normalmente são usados 50 surrogates para o mesmo conjunto de dados.

A significância S é

$$S = \frac{|IMM - \langle IMM_{surrogate} \rangle|}{\sigma_{surrogate}},$$

onde $\langle IMM_{surrogate} \rangle$ é a média dos surrogates e $\sigma_{surrogate}$ é o desvio padrão.

Quanto maior for o valor de S , mais longe o valor da IMM se encontra da média dos surrogates e, portanto, mais confiável o resultado obtido para a série original.

Para ilustrar o mecanismo de transmissão de informação (a detalhada posição dos potenciais de ação dentro de um burst) que ocorre entre os neurônios biológicos do STG fizemos uma preparação com o STG do siri azul conforme descrito na seção 4.1. O circuito foi mantido intacto (com todas as sinapses naturais e neurônios). Séries temporais longas (~1 hora) e simultâneas de medidas intracelulares dos neurônios PD, LP e VD foram digitalizadas a uma taxa de 10 kHz. A análise usando cálculo da informação mútua média transferida de um burst do LP para o burst seguinte do PD foi realizada conforme descrito acima, usando $N1 = 16$ bits, $N2 = 32$ bits e 8 bits para codificar os eventos (s e r). Os resultados são mostrados na figura 10.6.

Dois resultados mostrados na figura 10.6 não podem ser explicados pelos atuais conhecimentos que existiam sobre os neurônios do STG. O primeiro resultado inesperado é o pico de AMI observado em $(PDindex, LPindex) = \sim(0,2)$ que demonstra a capacidade que o PD tem de codificar na posição precisa de seus primeiros potenciais de ação em um burst o comportamento dos potenciais de ação dos bursts do LP. Isso não era esperado porque acreditava-se que os neurônios motores do STG teriam apenas a função fisiológica de comandar músculos lentos do estômago do animal e portanto a posição precisa dos potenciais de ação em um burst não deveriam ter nenhum significado especial. O segundo resultado inesperado é que mesmo que existisse essa capacidade de codificar o comportamento de outras células, um neurônio deveria expressar de maneira mais forte o que ocorreu mais recentemente. Em nossos experimentos observamos exatamente o contrário, o pico de AMI aparece entre o início dos bursts do PD e o início dos bursts do LP (0,2) e não no fim dos bursts do LP (0,15) como era esperado. Ou seja, o circuito parece estar sintonizado para que o PD codifique em seus potenciais de ação o momento em que o LP começou a disparar seu burst: a fase em que o LP disparou seu burst anterior. Como o PD pode expressar em um burst a atividade passada do LP, essa informação pode ser transmitida a outros neurônios do circuito não diretamente ligados ao LP quebrando, desta forma, barreiras temporais e espaciais e produzindo um elevado grau de correlação entre os componentes da rede.

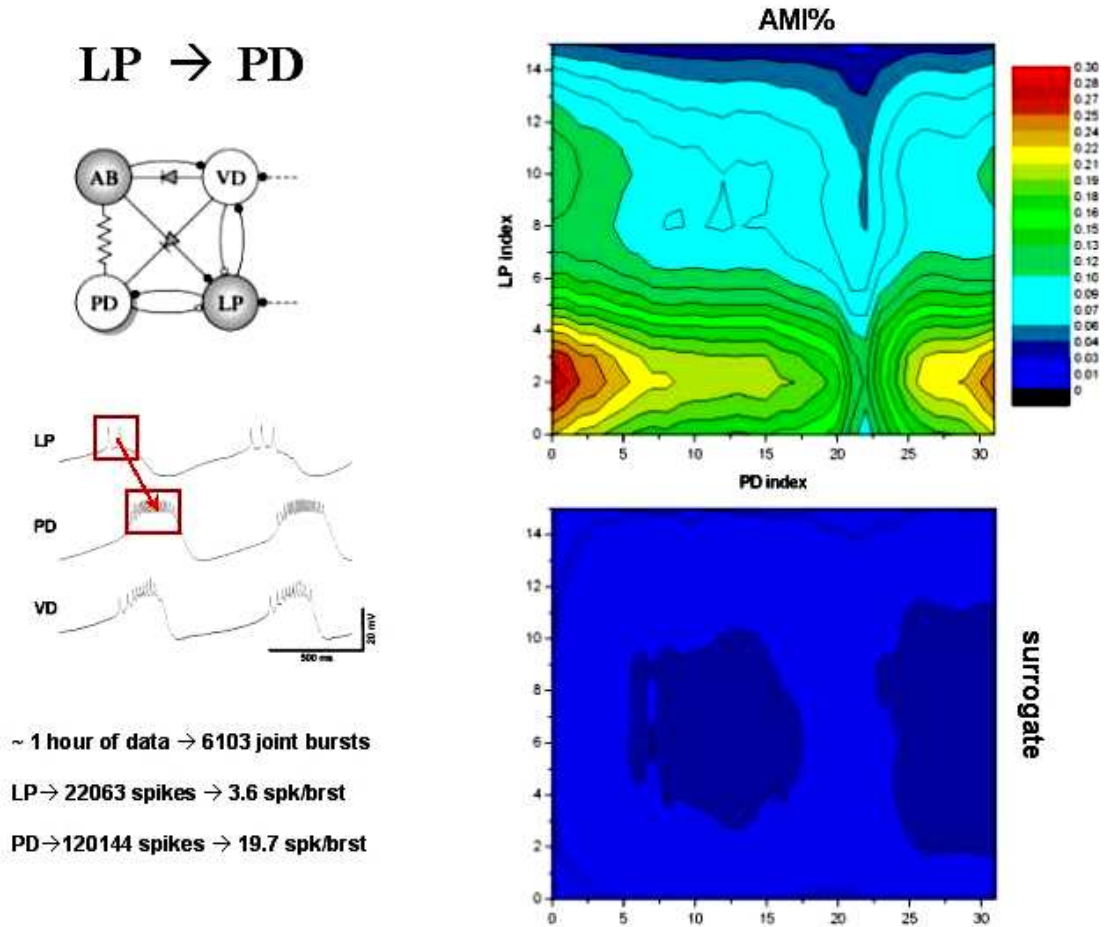


FIGURA 10.6 Cálculo da informação mútua média (AMI) entre bursts dos neurônios LP e PD no circuito pilórico intacto. Uma série de dados com 6102 bursts foi utilizada. É mostrada a AMI normalizada pela entropia do PD, que representa a fração da capacidade total de armazenar informação daquele trecho do burst do PD que é usada para codificar o comportamento do LP. A AMI calculada para verificar a significância do resultado também é mostrada.

Entretanto no circuito intacto existem muitas conexões químicas e elétricas entre os neurônios e não temos como garantir que a informação que o PD expressa sobre o LP venha apenas da sinapse LP→PD. Para elucidar estas questões realizamos experimentos conectando um computador (fonte de informação) ao neurônio PD, conforme descrevemos a seguir.

No experimento que realizamos conectando um neurônio LP artificial (computador) a um neurônio PD biológico, injetamos uma corrente negativa de amplitude suficiente para que o LP biológico ficasse hiperpolarizado e não disparasse potenciais de ação (desativando a sinapse biológica LP→PD).

Um programa *dynamic-clamp* em C++ foi preparado para monitorar o comportamento do PD e produzir em um determinado momento de sua hiperpolarização (fase fixa escolhida *a priori*) bursts com características (número médio de potenciais de ação/burst, duração do burst) similares às do LP biológico antes da hiperpolarização, porém com a posição dos potenciais de ação dentro do burst escolhida aleatoriamente. O sinal do computador foi introduzido no PD

biológico usando um modelo bastante simples de sinapse artificial, que apresenta pulsos de corrente de amplitude constante e independente do comportamento pós-sináptico, implementada por *dynamic-clamp*. Com a sinapse artificial ligada ou desligada nenhuma variação relevante da frequência de bursts do PD ou sua duração (duty-cycle) é observada, ou seja, os músculos comandados pelo PD estariam executando a mesma atividade em ambos casos.

Os resultados obtidos com o cálculo da AMI quando escolhemos uma fase para início do burst do LP artificial longe (perto) da fase natural do LP biológico são mostrados na figura 10.7 (10.8).

Observa-se na figura 10.7 que nenhuma informação significativa é transmitida do computador para o PD quando o computador dispara em uma fase adiantada em relação à fase do LP original. Mesmo quando os últimos potenciais de ação do LP artificial ocorrem na posição que corresponderia ao início do LP original a informação não é codificada pelo PD. O PD parece ignorar o comportamento do LP artificial.

Quando preparamos o LP artificial (CN) para disparar aproximadamente na mesma fase que o LP original dispararia, uma mudança dramática de comportamento ocorre (figura 10.8). O PD passa a codificar o comportamento do neurônio artificial e aparece um pico bastante pronunciado de AMI em $(PD_{index}, CN_{index}) = (0,13)$ e um pico menos pronunciado em $(0,2)$. Ou seja, o PD passa a codificar o início e o fim dos bursts do LP artificial, mas dedica maior capacidade de codificar informação ao final do burst do LP, que ocorreu mais recentemente. Acreditamos que esta inversão em relação ao que se observa nos experimentos com os dois neurônios biológicos (figura 10.6) se deve ao fato de termos usado um modelo de sinapse muito simples comparado à sinapse original LP→PD.

Desta maneira, a máxima informação mútua média ocorre quando o neurônio artificial dispara seu burst na mesma fase em que o neurônio biológico que está sendo substituído dispararia, ou seja, o circuito biológico está sintonizado para que os bursts inibidores ocorram na janela temporal onde a sensibilidade às condições iniciais é máxima e ocorre a máxima transmissão de informação, conforme exemplificado de maneira pictórica na Figura 10.9.

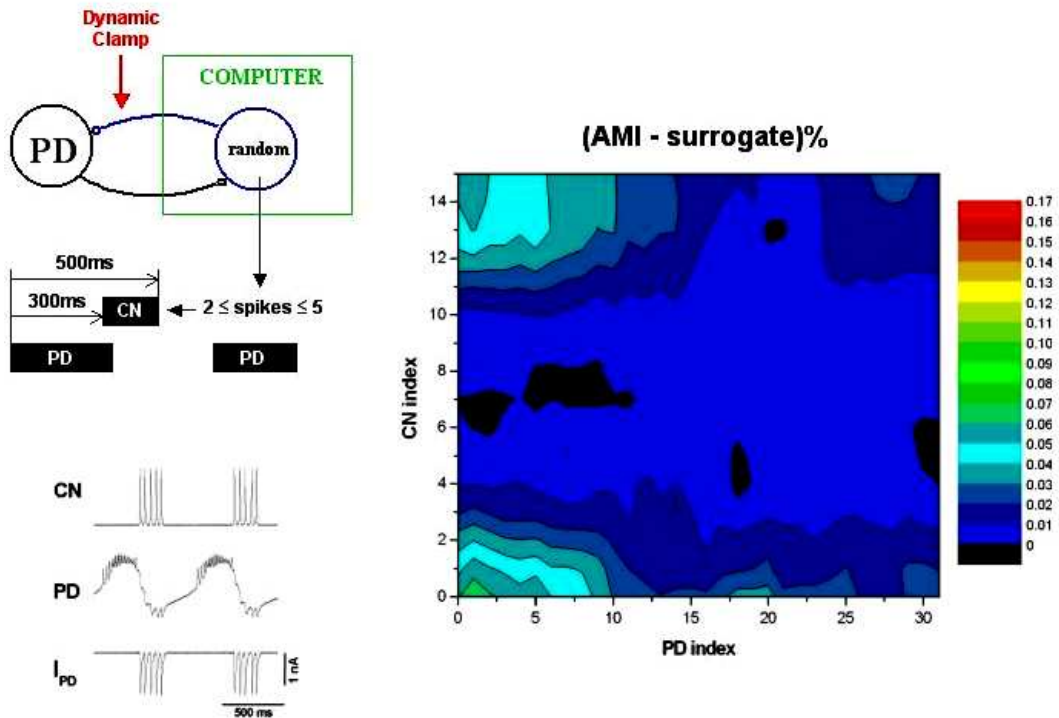


FIGURA 10.7 Fase de disparo do LP bem adiantada em relação à fase do LP original - Cálculo da informação mútua média (AMI) entre bursts dos neurônios LP artificial e PD biológico conectados usando *dynamic-clamp*. É mostrada a (AMI - AMI do surrogate) normalizada pela entropia do PD.

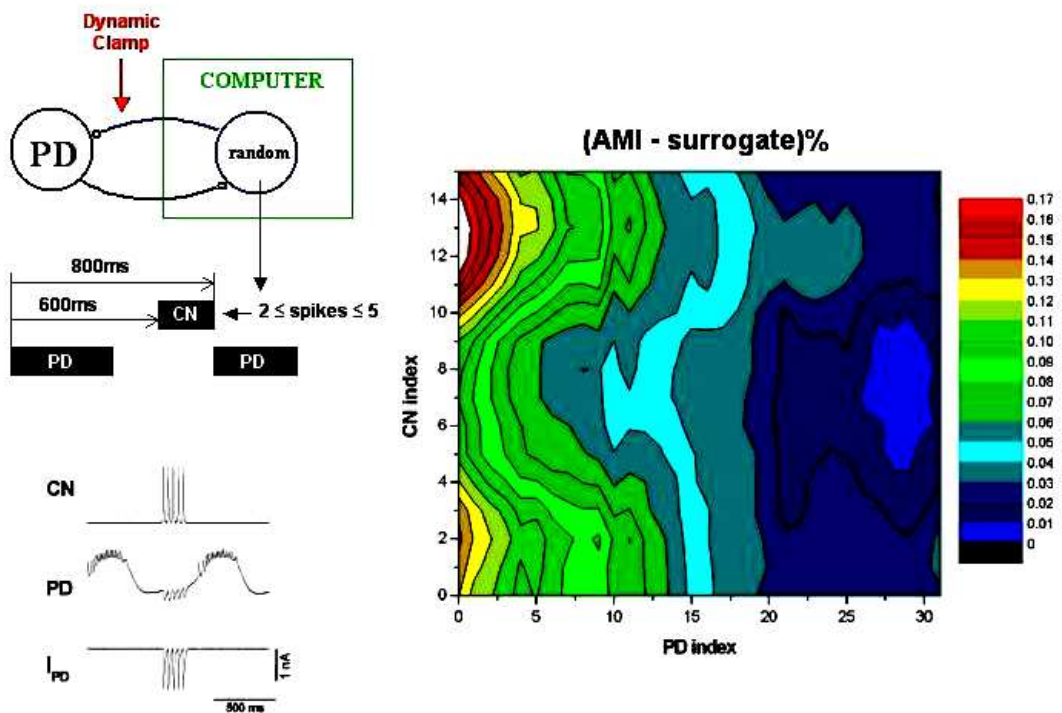


FIGURA 10.8 Fase de disparo do LP bem próxima à fase do LP original - Cálculo da informação mútua média (AMI) entre bursts dos neurônios LP artificial e PD biológico conectados usando *dynamic-clamp*. É mostrada a (AMI - AMI do surrogate) normalizada pela entropia do PD.

região com máxima
sensibilidade às
condições iniciais

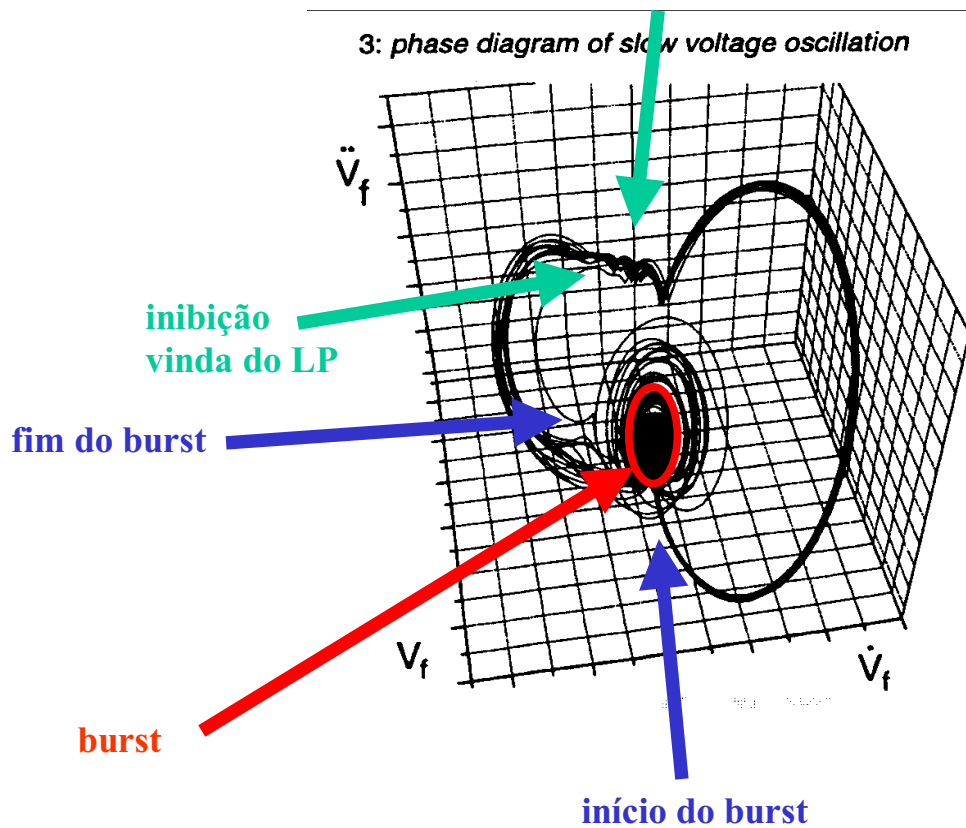


FIGURA 10.9 Representação pictórica do comportamento do neurônio PD mostrando como a sensibilidade às condições iniciais pode explicar o comportamento observado nos gráficos da informação mútua média (AMI) entre bursts dos neurônios LP e PD biológicos.

O mecanismo pelo qual o cérebro dos crustáceos controla o CPG pilórico é a neuromodulação. Assim, liberando diferentes substâncias neuromoduladoras no STG o cérebro pode ligar o circuito oscilador pilórico, desligá-lo, e controlar a fase de seus osciladores componentes. Até o momento acreditava-se que para controlar o CPG o cérebro usava apenas a informação vinda de sensores de estiramento muscular associados aos músculos que o CPG enerva, num laço de controle do tipo:

cérebro → CPG → músculos → sensores → cérebro

Esse tipo de controle, apesar de simples e funcional, apresenta alguns problemas. Por exemplo, no caso hipotético de um dos compartimentos pilóricos ficar entupido com um pedaço grande de alimento que impossibilite a contração do músculo associado, o sensor de estiramento/contração não irá mandar sua informação ao cérebro, e este poderá concluir que o CPG não está ativo e irá erroneamente mandar para o CPG uma sopa de neuromoduladores para que este comece a oscilar.

Com a descoberta da capacidade de processar informações dos neurônios motores do CPG pilórico surgiu a questão: será que o STG usa esta capacidade ou os neurônios motores simplesmente são capazes de fazê-lo mas esta característica não é aproveitada?

De todo o CPG pilórico, o único neurônio que manda seu axônio para gânglios superiores que podem se comunicar com o cérebro do animal é o interneurônio AB que juntamente com os 2 neurônios PD compõe o grupo marca-passo. Assim, se alguma informação sobre o comportamento de um neurônio do CPG chegar de modo não sensorial ao cérebro, esta informação terá que passar pelo neurônio AB. Já mostramos que o neurônio PD é capaz de codificar em seus bursts o comportamento do neurônio LP e como o PD é elétricamente acoplado ao AB, esta informação também certamente se encontra nos bursts do AB.

Em um trabalho de 2001, Böhm e colaboradores observaram que havia algum tipo de correlação não trivial entre os disparos apresentados no nervo inferior ventricular (*ivn*) e a frequência da atividade pilórica, mostrando que há uma relação entre a densidade média de spikes no *ivn* e a frequência de bursts do circuito pilórico. Entretanto, a atividade do *ivn* não tem componentes pilóricas em seu espectro de potências. No mesmo trabalho eles mapearam quais as regiões do cérebro do crustáceo (lagostim) eram enervadas pelo *ivn*, conforme mostramos na Figura 10.10.

O *ivn* é o único nervo que sai diretamente do sistema nervoso estomatogástrico e projeta no cérebro do animal. Isso nos motivou a realizar experimentos em que medimos a atividade do *ivn* em um siri decerebrado, juntamente com a atividade do neurônio LP (que não se conecta a gânglios superiores) e calcular a AMI entre estes dois sinais. Assim, toda a informação mútua média que estes apresentassem seria proveniente da atividade do LP e não o contrário. Como a componente extracelular do neurônio LP no nervo lateral ventral *lvn* é muito maior que a dos outros neurônios (PD e PY), conseguimos facilmente identificar o padrão de ISIs do LP na serie temporal da medida extracelular apenas olhando o valor do potencial acima de um determinado patamar e permitiu usar medidas exclusivamente extracelulares.

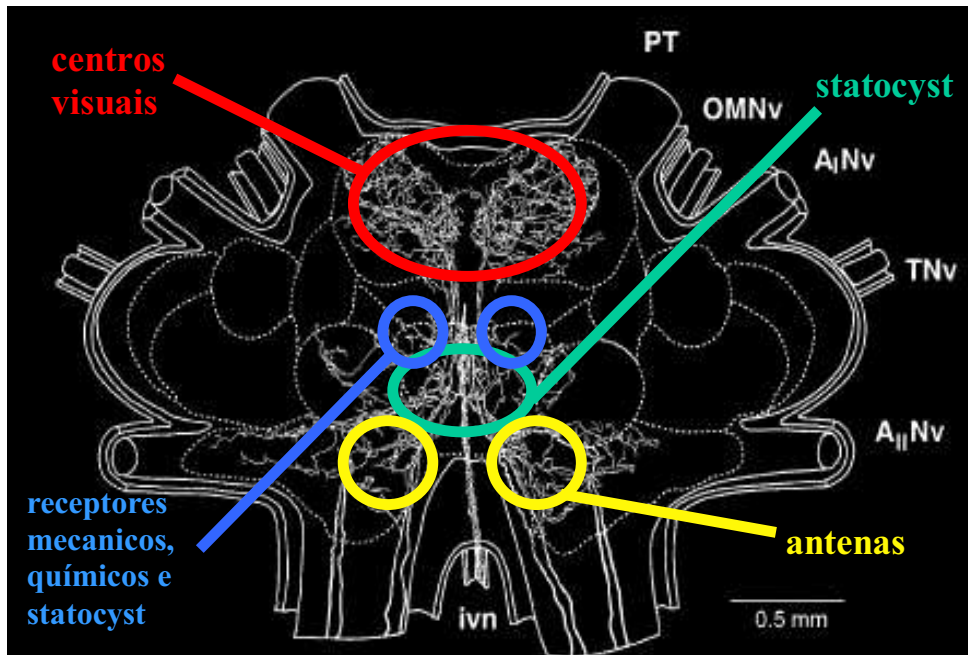


FIGURA 10.10 Vista ventral do cérebro de crayfish e a reconstrução das arborizações dendríticas dos axônios do ivn no cérebro. As linhas pontilhadas indicam as bordas dos diferentes neuropils no cérebro. Praticamente todas as regiões com as quais o ivn faz conexão correspondem a regiões sensoriais. Figura adaptada de Böhm et al., 2001.

Tomamos séries de dados longas (entre 1 e 2 horas) com mais de 6000 bursts do neurônio LP cada uma. Calculamos a porcentagem de IMM:

$$IMM \% = \frac{IMM(S, R)}{H(R)}$$

e a significância dos resultados conforme descrito anteriormente. Como neste conjunto de dados a densidade de spikes do LP é alta e do ivn é baixa, escolhemos 64 bits para codificar a atividade do LP e 80 bits para codificar a atividade do ivn no trecho [-5,5]s (usando como referência o primeiro spike dos bursts do LP).

Para simplificar a análise plotamos na figura 10.11 o valor da IMM% multiplicado pela significância S. Assim, os picos observados correspondem a máximos de significância que coincidem com máximos de IMM.

Observamos um pico bastante pronunciado da (IMM% x S) no ivn para os primeiros spikes do LP após 4 segundos do início do burst do LP. Este resultado não só concorda com o que já havíamos descoberto sobre o PD apresentar mais informação sobre o comportamento do início do burst do LP, como demonstra que essa informação antes de ser enviada ao cérebro passa por outros tipos de processamento nos gânglios superiores, por isso ela só aparece no ivn após 4 s.

Este resultado concorda com o que já sabemos sobre o STG, já que o PD é eletricamente acoplado ao AB, o único neurônio que tem axônios projetados em gânglios superiores.

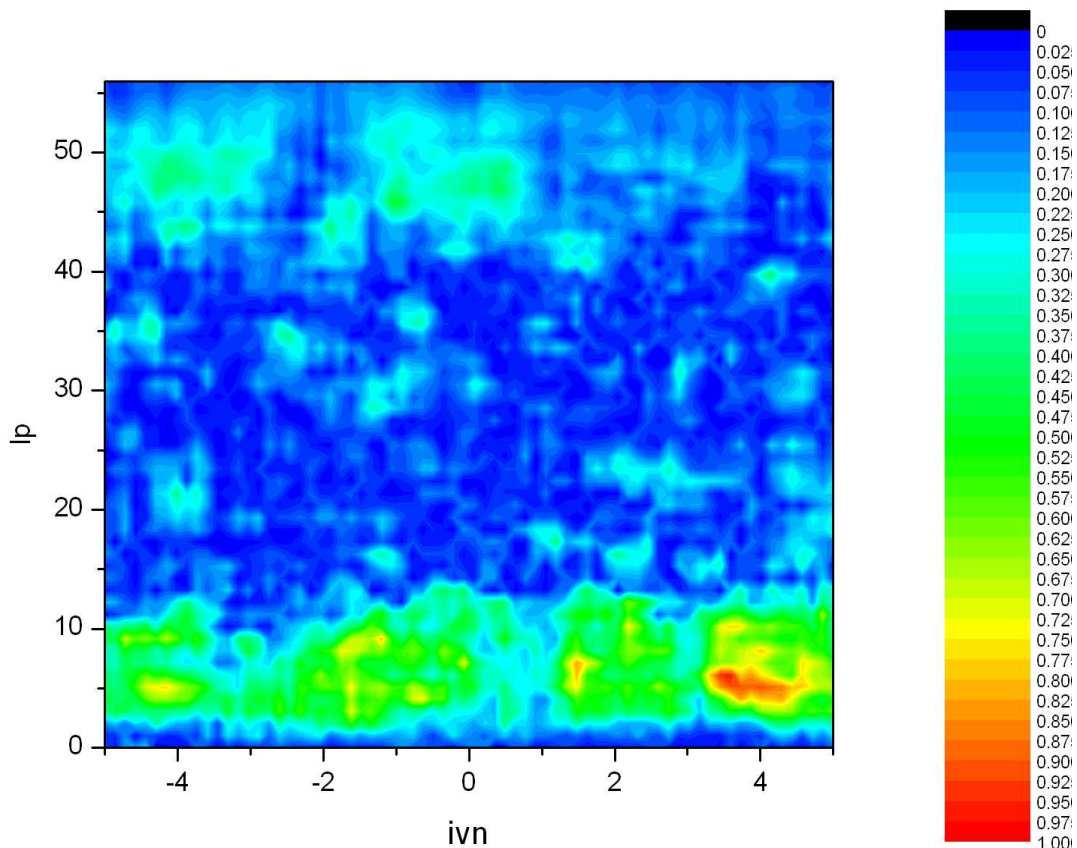
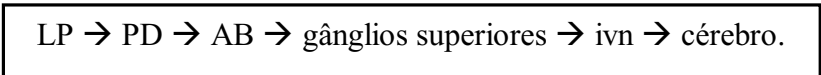


Figura 10.11 : LP & ivn, IMM% x S para uma série de dados com aproximadamente 2 horas de duração. O tamanho da palavra é de 64 bits para LP e 80 bits para ivn. Há um pico real de IMM em 4 segundos de atividade do ivn. O eixo do ivn está em unidades de segundos e o do LP está em unidades de bits para evidenciar a dependência temporal do processamento de informação no ivn.

Estes resultados sugerem que a informação que aparece no ivn sobre o LP deve seguir o caminho, antes completamente desconhecido:



A via que a informação percorre do AB ao ivn continua completamente desconhecida, ainda não sabemos quantos ou que tipos de neurônios transmitem esse sinal. Nossas medidas mostram que o ivn processa informação dos primeiros spikes do LP. Esta correlação aparece com um atraso de 4 segundos contados a partir do primeiro spike do burst do LP. Este resultado é interessante pois, mesmo sem podermos afirmar quase nada a respeito do que acontece nos gânglios superiores sabemos que a via tem um tempo de transmissão característico de ~ 4 segundos (aprox. 5 bursts pilóricos). Podemos então imaginar que, se o processamento nos gânglios superiores ocorrer em bursts sequenciais e de modo semelhante ao que acontece no CPG pilórico, aproximadamente 5 sinapses devem estar envolvidas.

11. Conclusão

Enormes progressos na neurociência virão de esforços multidisciplinares, misturando matemática, física, biologia, química, engenharia, etc...

Nesta tese foram apresentados os principais resultados de minhas atividades de pesquisa realizadas durante a instalação e consolidação do Laboratório de Fenômenos Não-Lineares no IFUSP, assim como as idéias que levaram a aplicar as técnicas de sistemas dinâmicos não-lineares a problemas em neurociência. Em seguida foram descritas as técnicas multidisciplinares desenvolvidas durante os dois anos de pós-doutoramento no Institute for Nonlinear Science – Universidade da Califórnia em San Diego. Finalmente foi descrita a implementação da linha de pesquisa em “Dinâmica Não-Linear de Redes Neurais Biológicas” no LFNL-IFUSP.

Na primeira fase, trabalhei no desenvolvimento de um aparato experimental no LFNL para o estudo de comportamentos complexos na dinâmica de formação de gotas d'água no bico de uma torneira. Foi montado um sistema hidráulico em circuito fechado, e um sistema de aquisição de dados automatizado, que também controla a abertura da torneira (uma válvula de agulha). Utilizando como parâmetro de controle a taxa de gotejamento estabelecida pela abertura da torneira observamos duplicações de período, bifurcação de Hopf, crises interiores e de fronteira, comportamentos intermitentes, e movimentos quase-periódicos. Utilizando métodos de caracterização topológica, estabelecemos rotas para o caos envolvendo tangências homoclínicas, e mostramos que o súbito desaparecimento de um atrator caótico, em altas taxas de vazão, era devido a uma “chaotic blue sky catastrophe”, um tipo de crise de fronteira apenas observada anteriormente num modelo usado por Van der Pol para simular a dinâmica cardíaca.

A descoberta de que neurônios biológicos apresentavam comportamento caótico atraiu minha atenção para estes sistemas. A possibilidade de aplicação imediata de todas as técnicas de análise desenvolvidas na primeira fase de minha carreira à dados de experimentos com dinâmica do tipo “íntegra e dispara”, como é o caso dos neurônios biológicos (bastava trocar as séries de intervalos entre gotas por séries de intervalos entre disparos dos neurônios!) e o interesse por áreas aplicadas e interdisciplinares me levaram a aprender as técnicas de dissecação e preparação do tecido nervoso vivo de crustáceos durante meu pós-doutoramento no INLS-UCSD.

Como sempre tive interesse em transitar entre o desenvolvimento de aparato experimental, modelagem, computação e eletrônica, logo percebi que a mistura de todas estas técnicas com a parte biológica recém apreendida, além da satisfação pessoal, poderia trazer bons resultados. Assim, me dediquei ao desenvolvimento de novas técnicas de interfaceamento entre tecido neural vivo e modelos computacionais ou circuitos eletrônicos através de *dynamic clamp*. Descrevemos os principais resultados obtidos nesta segunda fase em que trabalhamos com neurônios biológicos, modelos matemáticos, caracterização de série temporais, neurônios eletrônicos e teoria da informação também são resumidamente descritos.

Com meu retorno ao Brasil e a possibilidade de implantar no LFNL essa nova linha de pesquisa pude continuar a trabalhar com o sistema nervoso dos crustáceos e dar prosseguimento a vários trabalhos que havia iniciado durante o pós-doutoramento, através de colaborações com grupos do exterior, e também iniciar novos trabalhos com os estudantes do LFNL.

Mostramos como a montagem de um aparato de eletrofisiologia neural e a adaptação de técnicas interdisciplinares permitiu estudar o funcionamento de modelos da atividade elétrica de neurônios biológicos, o aparecimento de caos em modelos estocásticos de neurônios, a importância da presença de caos para os centros geradores de padrões e descobrir uma capacidade de processamento de informação dos neurônios motores do gânglio estomatogástrico de crustáceos, até então desconhecida.

12. Referências

- Abarbanel, H. D. I., Brown, R., Sidorowich, J. J. e Tsimring, L. S. (1993): The analysis of observed chaotic data in physical systems, *Rev. Mod. Phys.* **65**, 1331-1392.
- Abarbanel, H. D. I. (1996): *Analysis of Observed Chaotic Data*, Springer-Verlag, New York.
- Abarbanel, H. D. I., Huerta, R., Rabinovich, M. I., Rulkov, N., Rowat, P. F. e Selverston, A. I. (1996): Synchronized action of synaptically coupled chaotic model neurons, *Neural Computation* **8**, 50-65.
- Abraham, R. H. e Stewart, H. B. (1986): A chaotic blue sky catastrophe in forced relaxation oscillations, *Physica D* **21**, 394-400.
- Abraham, R. H. e Shaw, C. D. (1992): *Dynamics - the geometry of behavior - 2nd edition*, Addison-Wesley: Redwood City.
- 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., Haase, M. (1994): *An Exploration of Chaos*, North-Holland, Amsterdam.
- Ayers, J. (2004) Underwater walking, *Arthropod structure & development* **33**, 347-360.
- Bal, T., Nagy, F., Moulines, M. (1988) The pyloric central pattern generator in crustacea: a set of conditional neural oscillators. *J. Comp. Physiol. A* **163**, 715-727.
- Böhm, H., Dybek, E., and Heizel, H. G. (2001) Anatomy and in vivo activity of neurons connecting the crustacean stomatogastric nervous system to the brain. *J. Comp. Physiol. A* **187**, 392-403.
- Bonabeau, E., Theraulaz, G., Deneubourg, J. -L., Lioni, A., Libert, F. , Sawens, C. e Passera, L. (1998): Dripping faucet with ants, *Phys. Rev. E* **57**, 5904-5907.
- Borst, A. e Theunissen, F. E. (1999): Information theory and neural coding, *Nature Neurosci.* **2**, 947-957.
- Brezina, V., Orekhova, I. V., and Weiss, K. R. (2000) The neuromuscular transform: the dynamic, nonlinear link between motor neuron firing patterns and muscle contraction in rhythmic behaviors. *J. Neurophysiol.* **83**, 207-31.
- Brindley, J. e Kapitaniak, T. (1991): Analytic predictors for strange non-chaotic attractor, *Phys. Lett. A* **155**, 361-364.
- Cahalan, R. F., Leidecker, H. e Cahalan, G. D. (1990): Chaotic rhythms of a dripping faucet, *Comput. Phys.* **4**, 368-383.
- Carelli, P. V., Reyes, M. B., Sartorelli, J. C., Pinto, R. D.(2005): Whole cell stochastic model reproduces the irregularities found in the membrane potential of bursting neurons, *J. Neurophysiol.* em impressão, <http://jn.physiology.org/cgi/reprint/00070.2005v1>. **ANEXO 17**
- Dayan, P., Abbott, L. F. (2001) *Theoretical Neuroscience: computational and mathematical modeling of neural systems*, MIT Press.
- Denker, M., Szücs, A., Pinto, R. D., Abarbanel, H. D. I., Selverston, A. I. (2005): A network of electronic neural oscillators reproduces the dynamics of the periodically forced pyloric pacemaker group, *IEEE Transactions on Bio-Medical Engineering* **52**, 792-798. **ANEXO 18**

- Destexhe, A., Mainen, Z. F., and Sejnowski, T. J. (1994) Synthesis of models for excitable membranes, synaptic transmission and neuromodulation using a common kinetic formalism. *J. Comput. Neurosci.* **1**, 195-231.
- Ding, M. Z., Grebogi, C. e Ott, E. (1989): Dimension of strange nonchaotic attractors, *Phys. Lett. A* **137**, 167-172.
- Dreyer, K. e Hickey, F. R. (1990): The route to chaos in a dripping water faucet, *Am. J. Phys.* **59**, 619-627.
- Eguia, M. C., Rabinovich, M. I. e Abarbanel, H. D. I. (2000): Information transmission and recovery in neural communications channels, *Phys. Rev. E* **62**, 7111.
- Ellner, S., Nychka, D. W. e Gallant, A. R. (1992): LENNS, a program to estimate the dominant Lyapunov exponent of noisy nonlinear systems from time series data, Institute of Statistics Mimeo Series # 2235 (BMA Series # 39), Statistics Department, North Carolina State University, Raleigh NC 27695-8203.
- Elson, R. C., Selverston, A. I., Huerta, R., Rulkov, N., Rabinovich, M. I. e Abarbanel, H. D. I. (1998): Synchronous behavior of two coupled biological neurons, *Phys. Rev. Lett.* **81**, 5691-5695.
- Elson, R. C., Huerta, R., Abarbanel, H. D. I., Rabinovich, M. I., and Selverston, A. I. (1999) Dynamic control of irregular bursting in an identified neuron of an oscillatory circuit. *J. Neurophysiol.* **82**, 115-122.
- Elson, R. C. (2001) – comunicação privada.
- Emlen, J. M., Freeman, D. C., Mills, A., Graham, J. H. (1998): How organisms do the right thing: The attractor hypothesis, *Chaos* **8**, 717-726
- Falcke, M., Huerta, R., Rabinovich, M. I., Abarbanel, H. D. I., Elson, R. e Selverston, A. I. (2000): Modeling observed chaotic oscillations in bursting neurons: the role of calcium dynamics and IP₃, *Biol. Cybern.* **82**, 517-527
- Fitzhugh, R. (1961): Impulses and physiological states in models of nerve membrane, *Biophys. J.* **1**, 445-466.
- Gilmore, R. (1998): Topological analysis of chaotic dynamical systems, *Rev. Mod. Phys.* **70**, 1455-1529.
- Gleick, J. (1990): *Caos, a criação de uma nova ciência*, Editora Campus, Rio de Janeiro.
- Gonçalves, W. M., Pinto, R. D., Sartorelli, J. C., and de Oliveira, M. J. (1998): Inferring statistical complexity in the dripping faucet experiment, *Physica A* **257**, 385-389. **ANEXO 32**
- Gonçalves, W. M., Pinto R. D., and Sartorelli J. C. (1999): Symbolic dynamics analysis in the dripping faucet experiment, *Physica D* **134**, 267-274. **ANEXO 30**
- Grassberger, P. e Procaccia, I. (1983): Measuring the strangeness of strange attractors, *Phys. D* **9**, 189-208; Characterization of strange attractors, *Phys. Rev. Lett.* **50**, 346-349.
- Guckenheimer, J., and Oliva, R. (2002) Chaos in the Hodgkin-Huxley model. *SIAM J. Applied Dyn. Systems* **1**, 105-114.
- Harris-Warrick, R. M. (2002) Voltage-sensitive ion channels in rhythmic motor systems. *Curr. Opin. Neurobiol.* **12**, 646-51.

- Hegger, R., Kantz, H., and Schreiber, T. (1999) Practical implementation of nonlinear time series methods: the TISEAN package, *Chaos* **9**, 413-435; TISEAN is freely downloadable at <http://www.mpipks-dresden.mpg.de/~tisean/>.
- Hille, B. (2001) *Ionic channels of excitable membranes*, 3rd ed., Sinauer, Sunderland, MA.
- 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.
- Hodgkin, A., Huxley, A. (1952): A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve, *J. Physiol. (London)* **117**, 500-544.
- Holden, A. V. (1997): Nonlinear Science - The impact of Biology, *Int. J. Bif. and Chaos* **7**, 2075-2104
- Hooper, S. L., and Weaver, A. L. (2000) Motor neuron activity is often insufficient to predict motor response. *Curr. Opin. Neurobiol.* **10**, 676-82.
- Ikeda, M. (2004): Calcium dynamics and circadian rhythms in suprachiasmatic nucleus neurons, *Neuroscientist* **10**, 315-324.
- Izhikevich, E. (2000): Neural excitability, spiking and bursting, *Int. J. Bif. Chaos* **10**, 1171-1266.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H. e Jessel, T. M. (1991): Principles of Neural Science, 3rd ed., Appleton & Lange, Connecticut.
- Kepler, T. B., Marder, E. e Abbott, L. F. (1990): The effect of electrical coupling on the frequency of model neuronal oscillators, *Science* **248**, 83-85.
- Komendantov, A. O., and Kononenko, N. I. (1996) Deterministic chaos in mathematical model of pacemaker activity in bursting neurons of snail *Helix pomatia*. *J. theor. Biol.* **183**, 219-230.
- Levi, R., Samoilova, M., and Selverston, A. I. (2003) Calcium signaling components of oscillating invertebrate neurons in vitro. *Neuroscience* **118**, 283-296.
- Levitan, I. B., Kaczmarek, L. K. (1997) *The neuron: cell and molecular biology*, 2nd ed., Oxford, Houston, TX.
- Lewin, R. (1993): *Complexidade - a vida no limite do caos*, Rocco, Rio de Janeiro.
- Li, T. Y. e Yorke, J. A. (1975): Period 3 implies chaos, *Am. Math. Month.* **82**, 985-992.
- Li, X. V., Stojkovic, S. S., Keiser, J. e Rinzel, J. (1997): Sensing and refilling calcium stores in an excitable cell, *Biophys. J.* **72**, 1080-1091.
- Mainen, Z. F. & Sejnowski, T. (1995), Reliability of spike timing in neocortical neurons. *Science* **268**, 1503-1508.
- Manor, Y., Nadim, F., Epstein, S. Ritt, J., Marder, E. e Kopell, N. (1999): Network oscillations generated by balancing graded asymmetric reciprocal inhibition in passive neurons, *J. Neurosci.* **19**, 2765-2779.
- Marder, E. e Selverston, A. I. (1992): Modeling the stomatogastric nervous system. Em: *Dynamic Biological Networks: The Stomatogastric Nervous System*, eds. Harris-Warrick, R. M. et al., MIT Press, Cambridge, MA.
- Marder, E. (1998): From biophysics to models of network function, *Annu. Rev. Neurosci.* **21**, 25-45.
- Martien, P., Pope, S. C., Scott, P. L. e Shaw, R. S. (1985): The chaotic behavior of a leaky faucet, *Phys. Lett. A* **110**, 399-404.

- Morris, C., Lecar, H. (1981): Voltage oscillations in the barnacle giant muscle fiber, *Biophys. J.* **35**, 193-213.
- Morris, L. G., and Hooper, S. L. (1997) Muscle response to changing neuronal input in the lobster (*Panulirus interruptus*) stomatogastric system: spike number- versus spike frequency- dependent domains. *J. Neurosci.* **17**, 5956-71.
- Mulloney, B., Selverston, A. I. (1974), Organization of the stomatogastric ganglion of the spiny lobster, *J. Comp. Physiol.* **91**, 1-32.
- Nicolelis, M. A. L. (2003) Brain machine interfaces to restore motor function and probe neural circuits, *Nature Rev. Neurosci.* **4**, 417-422.
- Núñez-Yépez, H. N., Salas-Brito, A. L., Vargas, C. A. e Vicente, L. A. (1989): Chaos in a dripping faucet, *Eur. J. Phys.* **10**, 99-105.
- de Oliveira, P. M. C. e Penna, T. J. P. P. (1994): Lattice simulation of leaky faucet dynamics, *Int. J. Mod. Phys. C* **5**, 997-1006.
- Parri, H. R., and Crunelli, V. (2001) Pacemaker calcium oscillations in thalamic astrocytes *in situ*. *Neuroreport* **12**, 3897-3900.
- Peng, C. -K., Mietus, J., Hausdorff, J. M., Haulin, S., Stanley, H. E. e Goldberger, A. L. (1993): Long-range anticorrelations and non-gaussian behavior of the heartbeat, *Phys. Rev. Lett.* **70**, 1343-1346.
- Penna, T. J. P., de Oliveira, P. M. C., Sartorelli, J. C., Gonçalves, W. M., and Pinto, R. D. (1995): Long-range anticorrelations and non-Gaussian behavior of a leaky faucet, *Phys. Rev. E* **52**, 2168R. **ANEXO 35**
- Pinto, R. D., Gonçalves, W. M., Sartorelli, J. C., and de Oliveira, M. J. (1995): Hopf bifurcation in a leaky faucet experiment, *Phys. Rev. E* **52**, 6896. **ANEXO 36**
- Pinto, R. D., Gonçalves, W. M., Sartorelli, J. C., Caldas, I. L., and Baptista, M. S. (1998): Interior crises in a dripping faucet experiment, *Phys. Rev. E* **58**, 4009-4011 (1998). **ANEXO 31**
- Pinto, R. D., and Sartorelli, J. C. (2000a): Homoclinic tangency and chaotic attractor disappearance in a dripping faucet, *Phys. Rev. E* **61**, 342-7. **ANEXO 28**
- Pinto, R. D., Varona, P., Volkovskii, A. R., Szücs A., Abarbanel, H. D. I., and Rabinovich M. I. (2000b): Synchronous behavior of two coupled electronic neurons, *Phys. Rev. E* **62**, 2644-56. **ANEXO 27**
- Pinto, R. D., Sartorelli, J. C., and Gonçalves, W. M. (2001a): Homoclinic tangencies and routes to chaos in a dripping faucet experiment, *Physica A* **291**, 244-54. **ANEXO 25**
- Pinto, R. D., Elson, R. C., Szücs, A., Rabinovich, M. I., Selverston A. I., and Abarbanel, H. D. I. (2001b): Extended dynamic clamp: controlling up to four neurons using a single desktop computer and interface, *J. Neurosci. Methods* **108**, 39-48. **ANEXO 23**
- Prinz, A. A., Thirumalai, V., Marder, E. (2003): The functional consequences of changes in the strength and duration of synaptic inputs to oscillatory neurons, *J. Neuroscience* **23**, 943-954
- Prinz, A. (2004) Neural networks: models and neurons show hybrid vigor in real time. *Curr. Biol.* **14**, R661-R662.
- Prinz, A. A., Ramirez, J. M., Buzsaki, G., Stanley, K. J. (2004) How dynamic interactions of intrinsic bursting and synaptic properties shape network functions, Program No. 813. Abstract Viewer/Itinerary Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, San Diego, USA.

Rabinovich, M. I., Abarbanel, H. D. I., Huerta, R., Elson, R. E Selverston, A. I. (1997): Self-regularization of chaos in neural systems: experimental and theoretical results, *IEEE Trans. Circuits Systems I* **44**, 997-1005.

Rabinovich, M. I., Pinto R. D., and Huerta R. (2001): Some problems of Information Neurodynamics, *Izv. VUZ Radiofiz., RPQAE* **44** (5-6), 439-463; *Radiophys. and Quantum Electronics* **44** (5-6), 403-427. **ANEXO 24**

Rabinovich, M. I., Pinto, R. D., Abarbanel, H. D. I., Tumer, E., Stiesberg, G., Huerta, R., Selverston, A. I.(2002): Recovery of hidden information through synaptic dynamics, *Network-Computation in Neural Systems* **13**, 487-501. **ANEXO 21**

Reyes, M. B., Pinto, R. D., Tufaile, A., Sartorelli J. C.(2002): Heteroclinic behavior in a dripping faucet experiment, *Physics Letters A* **300**, 192-198. **ANEXO 22**

Reyes, M. B. (2005): *Comportamento complexo em centros geradores de padrões*, tese apresentada ao IFUSP para a obtenção do título de doutor em ciências. **ANEXO 53.**

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

Rinzel, J. e Ermentrout, G. B. (1998): Analysis of neural excitability and oscillations. Em: *Methods in Neuronal Modelling*, eds. C. Koch e I. Segev, MIT Press, Cambridge, MA.

da Rocha, M. S. F., Sartorelli, J. C., Gonçalves, W., M., and Pinto, R. D. (1996): Some dynamical aspects of the water drop formation in a leaky faucet, *Phys. Rev.* **E 54**, 2378. **ANEXO 34**

Rössler, O. E. (1976): Different types of chaos in two simple differential equations, *Z. Naturf.* **31A**, 1664-1670.

Rössler, O. E. (1977): *Synergetics: a workshop*, Haken, H., Springer Verlag: Berlim, 174-183.

Ruelle, D. e Takens, F. (1971): On the nature of turbulence, *Comm. Math. Phys.* **20**, 167-192.

Salaj, E. (1999): IOPort 2.1, Cybermagic Productions, <http://www.cybermagic.co.nz/winsoft>.

Sartorelli, J. C., Gonçalves, W. M., and Pinto, R. D. (1994): Crisis and intermittence in a leaky faucet experiment, *Phys. Rev.* **E 49**, 3963. **ANEXO 37**

Sauer, T. D. (1997): Reconstruction of integrate-and-fire dynamics, *Fields Inst. Comm.* **11**, 63-75.

Schiff, S. J., Jerger, K., Chang, T., Sauer, T. e Aitken, P. G. (1994a): Stochastic versus deterministic variability in simple neuronal circuits, *Biophys. J.* **67**, 671-683.

Schiff, S. J., Jerger, K., Duong, D. H., Chang, T., Spano, M. L. e Ditto, W. L. (1994b): Controlling chaos in the brain, *Nature* **370**, 615-620.

Schneidman, E., Freedman, B., Segev, I. (1998): Ion channel stochasticity may be critical in determining the reliability and precision of spike timing, *Neural Computation* **10**, 1679-1703.

Selverston, A. I. and Moulins, M., eds. (1986) *The crustacean stomatogastric system*, Springer-Verlag, Berlim.

Selverston, A. I., Rabinovich, M. I., Abarbanel, H. D. I., Elson, R. C., Szücs, A., Pinto, R. D., Huerta, R., and Varona P. (2000): Reliable Circuits from Irregular Neurons: A Dynamical Approach to Understanding Central Pattern Generators, *J. Physiol. (Paris)* **94**, 357-74. **ANEXO 26**

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

- Sharp, A. A., O'Neil, M. B., Abbot, L. F. e Marder, E. (1993): Dynamic clamp: computer-generated conductances in real neurons, *J. Neurophysiol.* **69**, 992-995.
- Shaw, R. (1984): *The dripping faucet as a model chaotic system*, Aerial Press: Santa Cruz.
- Shilnikov, L. (1997): Mathematical problems of nonlinear dynamics: a tutorial, *Int. J. Bif. Chaos* **7**, 1953-2001.
- da Silva, J. G. M., Sartorelli, J. C., Gonçalves, W. M., and Pinto, R. D. (1997): A scale law in a dripping Faucet, *Phys. Lett. A* **226**, 269. **ANEXO 33**
- Skaugen, E., and Walløe, L. (1979) Firing behavior in a stochastic nerve membrane model based upon the Hodgkin-Huxley equations. *Acta Physiol. Scand.* **107**, 343-363.
- Skinner, F. K., Koppel, N. e Marder, E. (1994): Mechanisms for oscillation and frequency control in reciprocal inhibitory model neural networks, *J. Comput. Neurosci.* **1**, 69-87.
- So, P. e Ott, E. (1995): Controlling chaos using time delay coordinates via stabilization of periodic orbits, *Phys. Rev. E* **51**, 2955-2962.
- So, P. Ott, E., Schiff, S. J., Kaplan, D. T., Sauer, T. e Grebogi, C. (1996): Detecting unstable periodic orbits in chaotic experimental data, *Phys. Rev. Lett.* **76**, 4705-4708.
- So, P., Ott, E., Sauer, T., *et al.* (1997): Extracting unstable periodic orbits from chaotic time series data, *Phys. Rev. E* **55**, 5398-5417.
- So, P., Francis, J. T., Netoff, T. I., *et al.* (1998): Periodic orbits: A new language for neuronal dynamics, *Biophys. J.* **74**, 2776-2785.
- Szücs, A., Varona, P., Volkovskii, A. R., Abarbanel, H. D. I., Rabinovich, M. I. e Selverston, A. I. (2000): Interacting biological and electronic neurons generate realistic oscillatory rhythms, *Neuroreport* **11**, 563-569.
- Szücs, A., Elson, R. C., Rabinovich, M. I., Abarbanel, H. D. I. and Selverston, A. I. (2001): Nonlinear behavior of sinusoidally forced pyloric pacemaker neurons, *J. Neurophysiol.* **85**, 1623-1638.
- Szücs, A., Pinto, R. D., Rabinovich, M. I., Abarbanel H. D. I. e Selverston, A. I. (2003): Synaptic modulation of the interspike interval signatures of bursting pyloric neurons, *J. Neurophysiol.* **89**, 1363-1377. **ANEXO 20**
- Szücs, A., Vehovsky, A., Molnar, G., Pinto, R. D., Abarbanel H. D. I. (2004): Reliability and precision of neural spike timing: simulation of spectrally broadband synaptic inputs, *Neuroscience* **126**, 1063-1073. **ANEXO 19**
- Takens, F. (1981): Detecting strange attractors in turbulence, *Lecture Notes in Math.* **898**, Springer-Verlag, Berlin.
- Theiler, J., Eubank, S., Longtin, A., Galdrikian, B., and Farmer, J. D. (1992) Testing for nonlinearity in time series: the method of surrogate data, *Physica D* **58**, 77-94.
- Tufaile, A., Pinto, R. D., Gonçalves, W. M., and Sartorelli, J. C. (1999): Simulations in a dripping faucet experiment, *Phys. Lett. A* **255**, 58-64. **ANEXO 29**
- Turrigiano, G., LeMasson, G., and Marder, E. (1995) Selective regulation of current densities underlies spontaneous changes in the activity of cultured neurons. *J. Neurosci.* **15**(5), 3640-3652.
- White, J. A., Klink, R., Alonso, A., and Kay, A. R. (1998) Noise from voltage-gated ion channels may influence neuronal dynamics in the entorhinal cortex. *J. Neurophysiol.* **80**, 262-269.

White, J. A., Rubinstein, J. T., and Kay, A. R. (2000) Channel noise in neurons. *TINS* **23**, 131-137.

Wu, X. e Schelly, Z. A. (1989): The effects of surface tension and temperature on the nonlinear dynamics of the dripping faucet, *Phys. D* **40**, 433-443.

Zhang, M., Goforth, P., Bertram, R., Sherman, A., and Satin, L. (2003) The Ca^{+2} dynamics of isolated mouse β -cells and islets: implications for mathematical models. *Biophys. J.* **84**, 2852-2870.

Zhao, H. e Zheng, W. M. (1993): Symbolic analysis of the Hénon map at $a=1.4$ and $b=0.3$, *Comm. Theor. Phys.* **19**, 21-26.

São Paulo, 10 de setembro de 2005



Reynaldo Daniel Pinto