

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA

Terence Teixeira Duarte

Participação do teto óptico na resposta de orientação de um peixe elétrico de campo fraco *Gymnotus carapo*: principais neurotransmissores e vias envolvidas.

Ribeirão Preto

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA

Terence Teixeira Duarte

Participação do teto óptico na resposta de orientação de um peixe elétrico de campo fraco *Gymnotus carapo*: principais neurotransmissores e vias envolvidas.

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em Ciências.**

Área de Concentração: Fisiologia
Orientadora: Profa. Dra. Anette Hoffmann

Ribeirão Preto

2007

Autorizo a reprodução total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Duarte, Terence Teixeira
Participação do teto óptico na resposta de orientação de um peixe elétrico de campo fraco *Gymnotus carapo*: principais neurotransmissores e vias envolvidas. Ribeirão Preto, 2007.

119 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Fisiologia.
Orientador: Hoffmann, Anette.

1. Peixe elétrico de campo fraco. 2. Teto óptico. 3. Modulações da descarga do órgão elétrico. 4. Resposta de orientação. 5. Sistemas GABAérgico e Glutamatérgico.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Terence Teixeira Duarte

Participação do teto óptico na resposta de orientação de um peixe elétrico de campo fraco *Gymnotus carapo*: principais neurotransmissores e vias envolvidas.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia.

Aprovada em: ___/___/___

Banca Examinadora

Profa. Dra. Eliane Comoli

FMRP-USP Assinatura _____

Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra

FMRP-USP Assinatura _____

Profa. Dra. Liliam Midori Ide

FUNREI Assinatura _____

Profa. Dra. Rosana Mattioli

CCBS-UFSCar Assinatura _____

Profa. Dra. Anette Hoffmann

FMRP-USP Assinatura _____

“C’est la vie; That’s life....

um tranqüilo triunfo interior com uma mistura de melancolia reconhecida”

(Heinz Kohut)

À Anette Hoffmann

.... O homem não nasce racional, mas pode tornar-se racional: tudo depende do esforço para combater o acaso, os encontros fortúitos, selecionando e organizando os bons encontros, isto é, no lugar daqueles que mutilam e diminuem nossa potência de pensar e agir (paixões tristes), selecionar aqueles que compõem conosco e nos inspiram paixões alegres, sentimentos que convêm à razão”.

(Adauto Novaes, O desejo)

Quem sempre me inspirou.

**À Aparecida de Souza Fim Pereira
(Cidinha)**

Pela assistência técnica especializada;

Pelo seu apoio eficiente e sereno;

Pela amizade, conselhos e carinho.

Minha “segunda” mãe!

Aos meus pais (João Garcia e Yara)

“... O tar medo é desse jeito mêmo: quando que ele passa da conta vira de natureza, aí pode que vira é corage...

... Eu tem pra mim que os medo é inté mais pirigoso que a corage. Eu tem pra mim que a corage é os medo bãõ, os medo carculado, c’as conta pronta. A corage carcula inhantes de puxá os dedo. O tar medo não, é a corage dismiolada...

... E tem ôta: nos medo vancê num vê é nada, só carcula no onça, só vê a onça. A onça! A onça!. Num óia o céu azurzim c’as nuve branca, num óia a florzica marela, num vê o rego d’água, num vê é nada...”

(Dioguinho: o matador de punhos de renda, João Garcia.)

Que me ensinaram a não ter medo e a admirar o céu azul, a flor amarela...

Vem sentar-te comigo, Lúdia

Vem sentar-te comigo Lúdia, à beira do rio.
Sossegadamente fitemos o seu curso e aprendamos
Que a vida passa, e não estamos de mãos enlaçadas.
(Enlacemos as mãos.)

Depois pensemos, crianças adultas, que a vida
Passa e não fica, nada deixa e nunca regressa,
Vai para um mar muito longe, para ao pé do Fado,
Mais longe que os deuses.

Desenlacemos as mãos, porque não vale a pena cansarmos-nos.
Quer gozemos, quer não gozemos, passamos como o rio.
Mais vale saber passar silenciosamente
E sem desassossegos grandes.

Sem amores, nem ódios, nem paixões que levantam a voz,
Nem invejas que dão movimento demais aos olhos,
Nem cuidados, porque se os tivesse o rio sempre correria,
E sempre iria ter ao mar.

Amemos-nos tranqüilamente, pensando que podíamos,
Se quiséssemos, trocar beijos e abraços e carícias,
Mas que mais vale estarmos sentados ao pé um do outro
Ouvindo correr o rio e vendo-o.

Colhemos flores, pega tu nelas e deixa-as
No colo, e que o seu perfume suavize o momento -
Este momento em que sossegadamente não cremos em nada,
Pagãos inocentes da decadência.

Ao menos, se for sombra antes, lembrar-te-ás de mim depois
Sem que a minha lembrança te arda ou te fira ou te mova,
Porque nunca enlaçamos as mãos, nem nos beijamos
Nem fomos mais do que crianças.

E se antes do que eu levores o óbolo ao barqueiro sombrio,
Eu nada terei que sofrer ao lembrar-me de ti.
Ser-me-ás suave à memória lembrando-te assim - à beira-rio,
Pagã triste e com flores no regaço.

(Ricardo Reis, Fernando Pessoa).

Ao Luiz Artur e ao João Artur.

Agradecimentos

À minha sogra (Ana Maria Poletto Chaves), por todo o cuidado com meu filho.

Ao professor João Kazuyuki Kajiwara, pela incansável disposição em partilhar seus conhecimentos.

À Silvana Delfino Moreira, por resolver todos os problemas burocráticos e pela disponibilidade em ajudar.

Às professoras Eliane Comoli, Liliam Midori Ide, Rosana Mattioli e ao professor Norberto Cysne Coimbra, membros da banca avaliadora, pelas considerações apresentadas.

Aos professores do Departamento de Fisiologia, pelo convívio e conhecimentos partilhados.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia, pela cordialidade, convívio e favores.

Aos colegas da Pós-Graduação.

À CAPES, por tornar nossos projetos possíveis.

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	iii
Lista de abreviaturas e siglas	iv
1 – Introdução	1
1.1. – <i>Participação do teto óptico nas respostas de orientação</i>	4
1.2. - <i>Participação do teto óptico nas respostas de captura de presa</i>	8
1.3. - <i>Participação do teto óptico nas respostas defensivas</i>	9
2 – Objetivos gerais	12
2.1 – <i>Objetivos específicos</i> :.....	12
3 – Materiais e Métodos	13
3.1. – <i>Procedimento Cirúrgico</i>	13
3.2. – <i>Cânula-Guia</i>	14
3.3. – <i>Procedimento Experimental</i>	14
3.4. – <i>Microinjeção Intracerebral das Drogas</i>	15
3.5. - <i>Drogas</i>	15
3.6. - <i>Aquisição da DOE</i>	16
3.7. - <i>Análise dos dados e tratamento estatístico</i>	16
3.8. - <i>Avaliação dos padrões esquelotomotores</i>	16
3.9. - <i>Grupos experimentais</i>	17
3.10. - <i>Procedimentos histológicos</i>	18
3.11. - <i>Determinação neuroanatômica das conexões do TeO de <i>Gymnotus carapo</i></i>	18
4 – Resultados	22
4.1- <i>Efeitos eletro e esquelotomotores decorrentes da interferência farmacológica em receptores GABAérgicos do TeO de <i>Gymnotus carapo</i></i>	22
4.1.1- <i>Efeitos eletromotores</i>	22
Grupo 1:.....	22
Grupo 2:.....	22
Grupo 3:.....	23
Grupo 4:.....	23
Grupo 5:.....	24
Grupo 6:.....	24
4.1.2- <i>Efeitos esquelotomotores</i>	25
Grupo 1:.....	25
Grupo 2:.....	25
Grupo 3:.....	25
Grupo 4:.....	26

4.2- Efeitos eletro e esquelomotores decorrentes da interferência farmacológica em receptores Glutamatérgicos do TeO em <i>Gymnotus carapo</i>	26
4.2.1- Efeitos eletromotores.....	26
Grupo 7:.....	27
4.2.2- Efeitos esquelomotores.....	27
4.3- Histologia.....	28
4.4- Determinação por técnica de rastreamento, das possíveis vias envolvidas nos efeitos eletro e esquelomotores observados após as microinjeções de bicuculina e NMDA no TeO de <i>Gymnotus carapo</i>	28
Figuras	31
5 – Discussão	48
5.1. - Efeitos eletromotores decorrentes da interferência farmacológica em receptores GABAérgicos do TeO de <i>Gymnotus carapo</i>	49
5.2. – Possíveis substratos neurais envolvidos nos efeitos eletromotores decorrentes da interferência farmacológica em receptores GABAérgicos do TeO de <i>Gymnotus carapo</i>	54
5.3. – Possíveis substratos neurais envolvidos na modulação dos processos atencionais de <i>Gymnotus carapo</i>	57
5.4. – Efeitos esquelomotores decorrentes da interferência farmacológica em receptores GABAérgicos do TeO de <i>Gymnotus carapo</i>	61
9 - Conclusões.....	64
10 - Referências Bibliográficas	66
11- Apêndices.....	74
Tabelas.....	74

Resumo

Nos vertebrados o teto óptico (TeO) e o seu homólogo nos mamíferos o colículo superior são responsáveis pelas tarefas integrativas multisensoriais orientacionais, assim como pelas respostas defensivas e de captura de presas.

Nos peixes elétricos de campo fraco, apesar de alguns trabalhos já terem demonstrado que estímulos visuais em movimento, apresentados sozinhos ou combinados com eletrosensoriais, ativam as células tectais, ainda hoje pouco se sabe sobre quais as vias neuronais, os tipos de neurotransmissores envolvidos e os estímulos usados na indução das diferentes respostas comportamentais. Assim o presente estudo teve por objetivo avaliar a participação do TeO e dos sistemas GABAérgico e Glutamatérgico na modulação de respostas comportamentais de *Gymnotus carapo*.

Nossos dados demonstraram que microinjeções de diferentes concentrações do antagonista GABA_A bicuculina (0,49 mM, 0,98 mM e 1,96 mM) nas camadas intermediárias e profundas do TeO provocaram episódios de aumentos abruptos na frequência da descarga.

As microinjeções prévias de 15,35 mM de muscimol nestas mesmas camadas do TeO foram capazes de bloquear os aumentos na frequência da descarga observados após as microinjeções de 0,98 mM de bicuculina neste mesmo sítio.

Observamos ademais que as microinjeções de NMDA (100 mM) no TeO provocaram episódios de aumentos na frequência da DOE similares àqueles observados após a microinjeção da maior concentração de bicuculina.

Como nos nossos resultados foi possível observar que as diferentes concentrações de bicuculina ou NMDA provocavam aumentos na frequência da descarga sem modulações da amplitude, aventamos que tais respostas podem ser

evocadas durante a eletrolocalização ativa destes animais e consideradas como uma resposta de orientação à um estímulo novo. Também aventamos também que os episódios de aumentos na frequência da DOE apresentados após a maior concentração de bicuculina ou NMDA no TeO podem estar envolvidos com a atenção.

Nossos achados neuroanatômicos demonstraram que após deposição do BDA nas camadas intermediárias e profundas do TeO, fibras varicosas foram marcadas na porção lateral do complexo formado pelo núcleos central posterior (CP) e pré-marcapasso (PPn CP/PPn e na camada VIII do toro semicircular dorsal (TSd) assim como neurônios retrogradamente marcados foram encontrados na região dorsocentral do telencéfalo dorsal (Dc).

Assim sugerimos possíveis substratos neurais que poderiam estar envolvidos nas modulações da DOE observadas nos nossos experimentos com *Gymnotus carapo*. Um possível substrato envolveria a conexão direta entre o TeO e o CP/PPn; um outro, a conexão bidirecional entre o TeO e o TSd.

As microinjeções de bicuculina ou NMDA no TeO de *Gymnotus carapo* além das modulações da DOE, induziram respostas motoras. O aparecimento de terminais na formação reticular rombencefálica, núcleo tegmental mesencefálico rostral e na medula espinal após o depósito de BDA no TeO, indica que várias vias podem estar envolvidas no controle de tais respostas motoras.

Abstract

The optic tectum (TeO) is a site of multisensory convergence and has a role in sensory-motor interfacing for orientation in most vertebrates. In weakly electric fish tectal cells are driven by electrosensory stimuli and the information arising from these cells is used in the control of electric behaviors. In the present work the role of the TeO on the electric organ discharge (EOD) and on motor response was explored in the pulse-type *Gymnotus carapo*. For this purpose bicuculline (0.245 mM; 0.49 mM; 0.98 mM and 1.96 mM), muscimol (15.35 mM), NMDA (100 mM), AP-5 (100 mM) and saline were microinjected (0.1 μ l) into the deep layers of the TeO of awakened unrestrained fish. A tract tracing technique was also employed using the biotinylated dextran amine into the TeO to reconstruct the underlying neural pathways mediating the electro and skeletomotor effects. For all dose, except 0.245 mM, microinjection of bicuculline and NMDA produced changes in the EOD frequencies that were characterized by an initial phase of gradual frequency, followed by a plateau where the EOD frequency increased at least 1-fold above the baseline frequency value and a long and variable period of frequency decrease. These responses were prevented by previous microinjection of muscimol. With the higher dose of bicuculline and NMDA, these episodes were mixed with short periods of shorter EOD frequencies increases. The EOD frequencies increases were positive correlated with skeletomotor patterns and we suggest that these responses might be a novelty response that are exhibited during the active electrolocation of novel environments. The frequency increases observed after the higher dose of bicuculline or NMDA may also reflect the underlying exploratory motivation and attention of weakly electric fish. The tract tracing experiments provided subsidies for possible pathways involved in the above mentioned functional result.

Lista de abreviaturas e siglas

AF	aumento abrupto na frequência da descarga do órgão elétrico
BDA	amina dextrana biotinilada
CCb	corpo cerebelar
CP/PPn	complexo formado pelos núcleos central posterior e pré-marcapasso
CS	colículo superior
Dc	região dorsocentral do telencéfalo dorsal
dLL	decussação do lemnisco lateral
DM2v	região ventral do telencéfalo dorsomedial
DOE	descarga do órgão elétrico
DPn	núcleo dorsal posterior do tálamo
ELL	lobo posterior da linha lateral
EPM	erro padrão da média
eTS	eferentes do toro semicircular
FLM	facículo longitudinal medial
FRM	formação reticular mesencefálica
fv	funículo ventral da medula espinhal
G	núcleo glomerular
LMRA	área reticular mesencefálica lateral
nE	núcleo eletrosensorial
nPPv	núcleo periventricular posterior
OC	quiasma óptico
RF	retorno da frequência para o seu valor basal
RF	formação reticular
RMT	núcleo tegmental mesencefálico rostral
RN	resposta de novidade
SAC	“stratum álbum centrale”
SGC	“stratum griseum centrale”
SM	“stratum marginale”
SO	“stratum opticum”
SPV	“stratum periventricularis”
TeO	teto óptico
TPP	núcleo do tubérculo posterior
TSd	toro semicircular dorsal
tSP	trato espinhal
tTB	trato tectobulbar
V	ventrículo

1 – Introdução

Nos vertebrados inferiores o teto do mesencéfalo é dominado por uma região retinorecipiente chamada de teto óptico (TeO), homólogo ao colículo superior (CS) nos mamíferos. Esta região pode ser considerada mais que um centro de processamento visual, já que recebe aferências topograficamente organizadas de outras modalidades sensoriais, tais como audição, tato e quando presentes, infravermelho e eletrossensibilidade (SKARF; HARTLINE, 1974; DRAGER; HUBEL, 1976; INGLE; SPRAGUE, 1977; BASTIAN, 1981; NEWMAN; HARTLINE, 1981; JONES, 1981; CARR et al., 1982). Uma das principais funções desta região é localizar um estímulo no espaço e provocar no animal respostas de orientação a esse estímulo (BUTLER, 1992). O TeO e o CS também são responsáveis pelas respostas de captura de presa e respostas defensivas (YAGER; SHARMA; GROVER, 1977; LAMING; BORCHERS; EWERT, 1984; AL-AKEL; GUTHRIE; BANKS, 1986; SAHIBZADA; DEAN; REDGRAVE, 1986; DEAN; MITCHELL; REDGRAVE, 1988a; 1988b; NORTHMORE; LEVINE; SCHNEIDER, 1988; DICKE; ROTH, 1994; LAMING et al., 1995; COMOLI; CANTERAS, 1997; HERRERO et al., 1998; BRANDÃO et al., 1999; COMOLI; CANTERAS, 2000; EICHENBERGER et al., 2001; MEREDITH et al., 2001, GAHTAN; TANGER; BAIER, 2005; SCHENBERG et al., 2005; MCCONVILLE; STERRITT; LAMING, 2006).

As combinações das informações multisensoriais influenciam a atividade dos neurônios tectais, que pode aumentar ou diminuir dependendo das características espaciais, temporais e físicas dos estímulos integrados. Frequentemente, as respostas fisiológicas produzidas pela combinação de estímulos diferentes, ocorrem mais rapidamente, são mais intensas sobretudo na fase inicial da resposta (ROWLAND et al., 2007).

Nos teleósteos, o teto é formado por cinco camadas sucessivas dispostas horizontalmente à superfície da estrutura e pode ser dividido em duas regiões funcionais formadas pelas camadas superficiais e pelas camadas intermediárias e profundas, sendo que as primeiras são sítios de projeções eferentes da retina, as quais terminam em mapas visuais topograficamente ordenados, enquanto as camadas intermediárias e profundas recebem informações, além das visuais, de outras modalidades sensoriais e estabelecem conexões descendentes com diversos núcleos pré-motores mesencefálicos e rombencefálicos, assim como podem alcançar a medula espinhal (ITO; BUTLER; EBBESSON, 1980; MEEK, 1983; HEILIGENBERG; ROSE, 1987; BEHREND; DONICHT, 1990; TORRES et al., 2002; PÉREZ-PÉREZ et al., 2003; GAHTAN; TANGER; BAIER, 2005; LUQUE et al., 2005; TORRES et al., 2005).

Em *Gymnotus carapo* o TeO pode ser dividido em três zonas principais: superficial, central e periventricular, e essas zonas são subdivididas em várias camadas de células e fibras. De acordo com VANEGAS; LAUFER; AMAT (1974), SAS; MALER (1986) e HEILIGENBERG; ROSE (1987) estas são as camadas:

“Stratum marginale” (SM) é a camada mais superficial do teto que contém fibras provenientes do toro longitudinal (TL), as quais fazem contatos sinápticos com os dendritos apicais dos neurônios bipolares localizados nesta mesma camada, só que mais profundamente.

“Stratum opticum” (SO) é a camada que contém a maior parte das fibras provenientes da retina, as quais terminam na camada “stratum fibrosum et griseum centrale” (SFGS). Os neurônios localizados nos limites destas camadas possuem uma rica árvore dendrítica que se ramifica para SM. Os axônios dessas células são finos e ramificam-se para SFGS.

“Stratum griseum centrale” (SGC) é a camada central que contém uma grande variedade de dendritos, axônios e corpos celulares. Estes últimos podem ser: piramidais com um axônio ascendente que se ramifica para SFGS, SO e SM e dendritos que se espalham para as camadas mais abaixo ou piriformes com um axônio ramificando-se dentro da própria SGC.

“Stratum album centrale” (SAC) é a camada que contém a maioria dos neurônios e fibras tectais eferentes. Os neurônios desta camada possuem os formatos monopolares ou multipolares, dendritos que se estendem desta camada para SGC e SFGS e axônios que deixam o TeO.

“Stratum periventricularis” (SPV) é a camada tectal mais profunda que contém neurônios monopolares os quais podem ou não apresentar um axônio eferente. Estas células apresentam os formatos ovóides ou piriformes.

Nos mamíferos o CS também é uma estrutura laminar que possui sete camadas de axônios e corpos celulares alternados. A informação visual é processada nas três camadas dorsais, sendo que a primeira camada (1) recebe projeção direta da retina e as camadas 2 e 3 recebem, via interneurônios, informações da camada 1 assim como projeções diretas descendentes do córtex pré-estriado, córtex médio temporal e córtex parietal. As quatro camadas ventrais recebem informações auditivas e somáticas, somando-se às projeções de outras origens. As projeções eferentes do CS incluem a substância negra par reticulata (SNr), os diversos núcleos pré-motores mesencefálicos e rombencefálicos que se conectam com os núcleos oculomotores, assim como com a medula espinhal (EDWARDS et al., 1979; GRANTYN; BERTHOZ, 1985; MOSCHOVAKIS; KARABELAS; HIGHSTEIN, 1988; DEAN; REDGRAVE; WESTBY, 1989; HARVEY; WORTHINGTON, 1990; KEAY et al., 1990; WESTBY et al., 1990; SHAMMAH-

LAGNADO; COSTA; RICARDO, 1992; COWIE; ROBINSON, 1994; OLIVIER; KITAMA; GRANTYN, 1994; WERNER; HOFFMANN; DANNENBERG, 1997; COMOLI et al., 2003; DOUBELL et al., 2003).

Nos peixes elétricos de campo fraco, projeções interlaminares de axônios tectais assim como a extensão de suas árvores dendríticas a lâminas vizinhas sugerem a existência de mecanismos de integração das informações multisensoriais abrangendo as diferentes camadas do TeO. Em *Eigenmannia* estímulos visuais estacionários induzem atividade de neurônios localizados nas camadas mais superficiais do TeO, enquanto que estímulos visuais em movimento, apresentados sozinhos ou combinados com eletrossensoriais, ativam as células tectais localizadas nas camadas mais profundas. Nesses casos, a integração das duas entradas sensoriais pode ser explicada por uma simples somação de efeitos: a adição do estímulo visual ao eletrossensorial aumenta a resposta produzida por essas células (BASTIAN, 1982).

1.1. – Participação do teto óptico nas respostas de orientação.

O teto óptico e seu homólogo o colículo superior utilizam as informações espacialmente localizadas no controle dos movimentos de orientação, os quais envolvem o redirecionamento dos olhos, orelhas, cabeça e corpo a fim de manter a região de maior acuidade visual no objeto de interesse (WURTZ; ALBANO, 1980; DEAN; REDGRAVE; SAHIBZADA; TSUJI, 1986; DEAN; MITCHELL; REDGRAVE, 1988a; NORTHMORE; LEVINE; SCHNEIDER, 1988; DEAN; REDGRAVE; WESTBY, 1989; WESTBY et al., 1989; COWIE; ROBINSON, 1994; FREEDMAN; SPARKS, 1997; WERNER; DANNENBERG; HOFFMANN, 1997). Movimentos rápidos que os olhos executam entre um ponto de fixação e outro (movimentos sacádicos) também podem

ser considerados como de orientação e são controlados pelo TeO e CS (KING; DEAN; REDGRAVE, 1991; PARÉ; GUITTON, 1994; WERNER; HOFFMANN; DANNENBERG, 1997). Estes movimentos ocorrem em resposta aos estímulos visuais, auditivos e táteis, assim como são evocados pela memória de localizações no espaço. As sacadas são estereotipadas, extremamente rápidas, e drogas, fadiga ou estados patológicos podem alterá-las. Os axônios das células coliculares envolvidas nestas respostas projetam-se para núcleos pré-motores mesencefálicos e rombencefálicos que, por sua vez, emitem fibras aos núcleos oculomotores (GRANTYN; BERTHOZ, 1985; DEAN; REDGRAVE; WESTBY, 1989; COWIE; ROBINSON, 1994). As conexões tectais com grupos pré-motores que se conectam com a medula espinhal também estão envolvidas nos mecanismos neurais das respostas de orientação (KEAY et al., 1990; WESTBY et al., 1990; SHAMMAH-LAGNADO; COSTA; RICARDO, 1992; WERNER; HOFFMANN; DANNENBERG, 1997).

Em macacos, a apresentação de um estímulo visual ou a lembrança de um alvo após as microinjeções de agonista GABAérgico (muscimol) nas camadas intermediárias do CS, evoca movimentos sacádicos que apresentam uma latência maior e amplitude e velocidade menores. Em contraste ao muscimol, as microinjeções do antagonista GABAérgico bicuculina, facilitam estes movimentos, aumentando sua frequência de ocorrência (KIKOSAKA; WURTZ, 1985). Estes autores sugerem que o substrato envolvido nestas respostas envolve a substância negra pars reticulata (SNr), e propõem que precedendo o movimento sacádico em direção ao alvo visual ou a sua lembrança, células da SNr reduzem brevemente a inibição tônica que mantêm sobre os neurônios tectais das camadas intermediárias. Estudos com fatias vivas do CS de ratos também demonstraram que a ativação de vias excitatórias envolvendo os receptores glutamatérgicos do tipo NMDA localizados nas camadas profundas do CS após a

desinibição GABAérgica é o mecanismo fundamental envolvido nos comportamentos de orientação (SAITO; ISA, 2003).

Nos peixes teleósteos o TeO é uma estrutura necessária para a execução das respostas de orientação, e estimulações elétricas desta estrutura podem provocar movimentos contralaterais apenas dos olhos, ou coordenados com movimentos do corpo. A direção e amplitude dos componentes horizontais e verticais desses movimentos são dependentes dos sítios tectais e envolvem conexões sítio-dependentes com núcleos pré-motores (MOSCHOVAKIS et al., 1998).

Em “goldfish” *Carassius auratus* estimulações elétricas de sítios tectais localizados rostral e medialmente provocam movimentos oblíquos dos olhos, cujo componente vertical é maior que o horizontal; já a ativação de sítios tectais localizados mais caudalmente evoca respostas dos olhos com características opostas (TORRES et al., 2005). Estudos neuroanatômicos demonstraram que, após injeções de traçadores nos sítios rostrais do TeO destes animais, terminais e corpos celulares foram encontrados na formação reticular mesencefálica (FRM), enquanto que injeções tectais mais caudais resultaram em marcações nesta mesma estrutura, só que mais caudalmente (PÉREZ-PÉREZ et al.; 2003). Estimulações elétricas da FRM também provocam movimentos dos olhos semelhantes aos tectais (TORRES et al., 2005) e, dessa maneira, essa estrutura pode servir como uma interface (constituída por diferentes sítios funcionais) que proporciona comandos motores com as características temporais solicitadas pelo teto. A bidirecionalidade destas conexões também sugere a participação da FRM na modulação dos comandos tectais já que esta última recebe informações sensoriais provenientes da medula (EWERT et al. 1990).

Nos peixes elétricos de campo fraco, como cada descarga do órgão elétrico (DOE) proporciona informações sobre o ambiente (eletrolocalização ativa), um

aumento na frequência da descarga reflete um aumento no fluxo de informações sensoriais para o peixe, que pode assim processar qual estímulo será analisado em detalhes e qual será levado em consideração para guiar seus comportamentos. Assim, nestes animais a resposta de orientação ou novidade (RN) é caracterizada por aumentos rápidos na frequência da descarga do órgão elétrico (DOE) seguidos por um declínio para o nível basal (LISSMANN, 1958) e são acompanhadas por movimentos estereotipados do corpo, os quais permitem alterar as relações espaciais entre os campos receptivos visuais e eletrosensoriais.

A RN ocorre frente à apresentação de estímulos novos e repentinos de diferentes modalidades sensoriais (mecânica, acústica, elétrica, visual), ou são evocadas quando uma série de estímulos com intervalos pequenos (<2s) e constantes é interrompida abruptamente. Mudanças nas características de um estímulo contínuo também são capazes de evocar a RN (POST; VON DER EMDE, 1999). Em *Gymnotus carapo*, a RN em decorrência da apresentação de pulsos de ondas quadradas (1 ms de duração, frequência de repetição de 70 Hz e uma corrente de 100 μ A) diminui sua magnitude frente à repetição do estímulo, mas não é totalmente abolida, mostrando uma habituação parcial. Também variações sazonais e drogas que alteram a vigília ou a emocionalidade influenciam essa resposta (CORRÊA; PEREIRA; HOFFMANN, 1999). Em *Hypopomus* a resposta de novidade ocorre em resposta à estimulação da subdivisão CP/PPn-G do complexo formado pelos núcleos central posterior (CP) e pré-marcapasso (PPn), cujas projeções liberam glutamato que se liga aos receptores NMDA ou AMPA das células marcapasso do núcleo marcapasso (Pn) situado no bulbo (KENNEDY; HEILIGENBERG, 1994). O Pn é um oscilador endógeno (ZUPANC; MALER, 1990) que dirige a atividade do órgão elétrico localizado ao longo do tronco do animal.

Como a RN pode ser evocada por estímulos de diferentes modalidades sensoriais (POST; VON DER EMDE, 1999) é possível que o teto participe na elaboração de tal resposta, já que células tectais localizadas nas camadas mais profundas também são ativadas por estímulos de diferentes modalidades sensoriais (BASTIAN, 1982) e conectam-se com núcleos pré-motores responsáveis por modulações da DOE (ZUPANC; HORSCHKE, 1996).

1.2. - Participação do teto óptico nas respostas de captura de presa.

O teto óptico também está envolvido nos comportamentos de captura de presa (SAHIBZADA, DEAN; REDGRAVE, 1986; DICKE; ROTH, 1994; LAMING et al., 1995; COMOLI; CANTERAS, 1997; HERRERO et al., 1998; COMOLI; CANTERAS, 2000; MEREDITH et al., 2001, GAHTAN; TANGER; BAIER, 2005) e em sapos estimulações elétricas desta estrutura resultam em respostas comportamentais características de tais comportamentos (LAMING; BORCHERS; EWERT, 1984). Estimulações elétricas de baixas intensidades ($< 50 \mu\text{A}$) provocam um aumento das respostas relacionadas com este comportamento como alerta, orientação, aproximação e captura, enquanto correntes acima de $50 \mu\text{A}$ provocam aumentos destas respostas, mas nesta situação um estímulo visual também provoca comportamentos de esquiva como retração (MCCONVILLE; STERRITT; LAMING, 2006).

Em *Carassius auratus* estimulações elétricas de baixa intensidade na porção anteromedial do teto induzem movimentos convergentes dos olhos e golpes pequenos e lentos das nadadeiras que podem estar envolvidos na captura de presas, já que permitem que estímulos visuais sejam projetados nas duas retinas centrais (HERRERO et al., 1998). O conhecimento relativo do envolvimento desta porção tectal na captura de presa é complementado por estudos realizados em animais nadando

livremente num aquário, os quais demonstraram que a estimulação do teto anterior provoca a captura de alimentos (AL-AKEL; GUTHRIE; BANKS, 1986) e que sua ablação bilateral inibe esta resposta (YAGER; SHARMA; GROVER, 1977).

Em ratos estudos demonstraram que a estimulação elétrica das camadas intermediárias e profundas do CS provoca respostas relacionadas ao controle da captura de presa (DEAN; MITCHELL; REDGRAVE, 1988a; DEAN; REDGRAVE; WESTBY, 1989) e estudos neuroanatômicos e funcionais identificaram que a via descendente teto-retículo-espinhal contralateral está envolvida nos movimentos de aproximação em direção aos estímulos novos (SAHIBZADA; DEAN; REDGRAVE, 1986; WESTBY et al., 1990).

1.3. - Participação do teto óptico nas respostas defensivas.

Vários trabalhos já demonstraram que o colículo superior dos roedores também está envolvido na produção de respostas defensivas como esquiva ou luta (DEAN; MITCHELL; REDGRAVE, 1988b; SAHIBZADA; DEAN; REDGRAVE, 1986; NORTHMORE; LEVINE; SCHNEIDER, 1988; BRANDÃO et al., 1999; EICHENBERGER et al., 2002; SCHERNBERG et al., 2005). Do ponto de vista funcional, parece inteiramente razoável uma estrutura envolvida na orientação, também estar envolvida com respostas defensivas (DEAN; REDGRAVE; WESTBY, 1989), já que o estímulo novo pode ser um sinal ameaçador iminente, como por exemplo, o aparecimento de um predador ou de um objeto em rota de colisão. Desta maneira, a decisão para a orientação deve estar intimamente ligada com a decisão de evitar o estímulo ou escapar dele. As evidências sobre a participação do CS na modulação de comportamentos defensivos resultam do fato de que lesões dessa

estrutura reduzem a probabilidade de ocorrência de respostas defensivas desencadeadas por estímulos visuais (BLANCHARD et al., 1989).

Em ratos, microinjeções de glutamato ou NMDA nas camadas profundas do CS produzem respostas defensivas como congelamento, corridas rápidas e saltos (DEAN, MITCHELL; REDGRAVE, 1988b), e estudos neuroanatômicos revelaram que camadas distintas do CS originam uma via ipsilateral que estabelece conexões com os núcleos parabigeminal, cuneiforme, pontino e formação reticular rombencefálica e que pode estar envolvida nas respostas defensivas, já que lesões desta via diminuem tais respostas (DEAN; REDGRAVE; WESTBY, 1989).

Em relação aos não-mamíferos, informações sobre as funções do TeO apontam nesta mesma direção. Em lagartos *Iguana iguana*, o teto é uma das regiões com alta probabilidade de produzir respostas de escape se estimulado eletricamente (DISTEL, 1978). Em *Carassius auratus* estimulações elétricas de alta intensidade (150 μ A) nas camadas intermediárias e profundas do TeO posterior evocam movimentos característicos das respostas de escape, tais como contrações dos músculos axiais ipsilaterais e giros da nadadeira que provocam giros do corpo, assim como movimentos ipsilaterais dos olhos (HERRERO et al., 1998). Na natureza, se um estímulo aparece atrás do animal, ativando a porção posterior do teto, ele pode ser considerado perigoso e então evoca respostas de escape. Estudos realizados em peixes nadando livremente num aquário, também demonstraram que esta porção do teto é uma área envolvida nas respostas de luta, já que estimulações elétricas provocam aumento da atividade do animal, ereção da nadadeira dorsal e movimentos rápidos de natação (AL-AKEL; GUTHRIE; BANKS, 1986).

Nos peixes elétricos de campo fraco é possível que o TeO também participe na elaboração e controle dos comportamentos defensivos, já que admissão colicular neste

sistema é filogeneticamente antiga e estudos anteriores do nosso laboratório já demonstraram que mecanismos GABAérgicos do TSd, estrutura homóloga ao colículo inferior dos mamíferos, estão envolvidos na elaboração de comportamentos defensivos específicos de *Gymnotus carapo*.

2 – Objetivos gerais.

Apesar dos estudos mostrados nesta introdução evidenciarem o envolvimento do TeO nas respostas de orientação, captura de presa e defesa, pouco se sabe sobre sua função nos peixes elétricos de campo fraco cujo sistema visual é pouco diferenciado. Também pouco se sabe sobre quais as vias neuronais, os tipos de neurotransmissores envolvidos e os estímulos usados na indução das diferentes respostas comportamentais. Assim, o presente estudo teve por objetivo avaliar a participação do TeO e dos sistemas GABAérgico e Glutamatérgico na modulação de respostas comportamentais de *Gymnotus carapo*.

2.1 – Objetivos específicos:

- Estudar os efeitos da desinibição GABAérgica do TeO por microinjeções de diferentes concentrações de bicuculina, um antagonista dos receptores do tipo GABA_A, na DOE basal, assim como na motricidade.
- Verificar se o pré-tratamento no TeO com muscimol, um agonista dos receptores do tipo GABA_A, é capaz de bloquear a resposta produzida pela microinjeção de 0,98 mM de bicuculina.
- Estudar as características da amplitude dos pulsos que compõem a resposta do OE à microinjeção de bicuculina no TeO em animais anestesiados e contidos.
- Estudar a possível participação dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA do TeO na modulação da frequência da DOE e do comportamento.
- Por meio de técnica de tracejamento neuronal, estudar as conexões do TeO. Para isto, utilizamos, como neurotraçador, a amina de dextrana biotinizada (BDA; 3000 MW, Molecular Probes, USA).

3 – Materiais e Métodos

Os peixes elétricos usados neste estudo pertencem à ordem Gymnotiforme, subordem Gymnotodei, família Gymnotidae, gênero *Gymnotus*, espécie *Gymnotus carapo*. Os exemplares utilizados foram comprados no comércio local e mantidos no Departamento de Fisiologia da FMRP em aquários individuais. Os aquários possuíam aeração contínua, a resistividade da água variava entre 100 – 200 K Ω / cm pH 6 - 7 e a temperatura entre 25 – 29°C. Os animais foram alimentados uma vez por semana com pequenas iscas vivas.

Os peixes mediam $24,6 \pm 1,1$ cm e pesavam $46,7 \pm 2,9$ g. Os cuidados com os animais, anestesia, cirurgia e eutanásia foram feitos de acordo com as normas do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e aprovados pela Comissão de ética em experimentação animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (N° 047/2003).

3.1. – Procedimento Cirúrgico

Os animais foram anestesiados por imersão numa solução contendo 0,2 g/l de MS222 (3- aminobenzoic acid ethyl ester, methanesulfonate salt; Sigma Chemical CO., St. Louis, MO, USA), até a parada dos movimentos das nadadeiras anal e laterais, removidos para a caixa cirúrgica, e durante a cirurgia, foram perfundidos através da guelra com solução anestésica de manutenção (MS222: Sigma: 0,18 g/l).

O peixe anestesiado, já na caixa cirúrgica, teve a cabeça imobilizada por um prendedor acoplado à caixa que permitiu intervenções na região cefálica. Um micromanipulador (Prior, England, UK), também acoplado à caixa, permitiu a realização dos procedimentos estereotáxicos. Após a assepsia da pele que recobria o

crânio, foi feita uma incisão cutânea longitudinal para exposição da calota craniana. Posteriormente, foi feito um orifício com auxílio de um motor manual de baixa rotação (Dremel, São Paulo, SP, Brasil), para a implantação da cânula-guia.

3.2. – Cânula-Guia

A cânula-guia possuía 5 mm de comprimento e foi confeccionada a partir de segmento de agulha hipodérmica com 0,7 mm de diâmetro externo. O orifício e posterior fixação da cânula-guia sobre a região do TeO foi feito unilateralmente, tendo como referência os eletrorreceptores situados rostralmente ao cérebro, no eixo interocular (eixo zero, frontal). Para a implantação da cânula-guia sobre a região do TeO, o eletrodo, acoplado à torre do micromanipulador, foi posicionado sobre o eixo zero movido 9 mm na direção caudal do eixo rostrocaudal a 2 mm lateralmente à linha média. Durante os experimentos para a microinjeção da droga, a agulha foi introduzida 0,5 mm de profundidade, a partir da superfície.

3.3. – Procedimento Experimental

Todos os animais utilizados nos experimentos permaneceram em aquários individuais por uma semana antes de serem submetidos ao procedimento cirúrgico e para lá retornaram após a cirurgia. Decorridas 48h da cirurgia, os peixes foram colocados, individualmente, em uma cuba (31 x 5 x 5 cm) com a mesma água do aquário e sob oxigenação contínua. Os experimentos tiveram início 10 minutos após a colocação do animal nessa cuba que continha um par de eletrodos móveis nas paredes internas. Após a ambientação, a DOE basal foi registrada num computador. O animal foi, então, removido do aquário com auxílio de uma rede de nylon e colocado sobre uma mesa por alguns segundos para a microinjeção intracerebral da droga.

3.4. – Microinjeção Intracerebral das Drogas

Para as microinjeções, utilizamos uma seringa Hamilton de 2,0 μ l (“Alltech Associates, Deefield, IL, USA”) acoplada a uma bomba de infusão (“Insight”, Ribeirão Preto, SP, Brasil) e regulada para injetar volumes de 0,1 μ l, durante 10 segundos. A seringa Hamilton estava conectada a um segmento de agulha dental (Mizzy-EUA; 15 mm de comprimento e 0.3 mm de diâmetro externo) por meio de um tubo de polietileno PE-10 de aproximadamente 30 cm. A parte distal do polietileno acoplada à agulha foi preenchida com a solução da droga utilizada, e a outra parte, inclusive a microseringa, com água destilada, com uma bolha de ar separando os dois líquidos. A agulha alcançou o tecido cerebral em profundidades específicas para a região visada do sistema nervoso, a partir da extremidade inferior da cânula-guia (0,5 mm). Após a microinjeção, o animal foi imediatamente recolocado no aquário, e o tempo experimental começou a ser contado.

3.5. - Drogas

As seguintes drogas, todas fornecidas pela Sigma (St. Louis, MO, USA), foram utilizadas: NMDA (agonista dos receptores glutamatérgico do tipo NMDA, “N-methyl-DL-aspartic acid”), AP-5 (antagonista dos receptores glutamatérgico do tipo NMDA, “DL-2-amino-5-phosphonopentanoic acid”), Bicuculina (antagonista dos receptores do tipo GABA_A, “Bicuculline methiodide”), Muscimol (agonista dos receptores do tipo GABA_A, Muscimol “5-Aminomethyl-3-hydroxyisoxazole hydrobromide”) e salina. As drogas foram diluídas em solução de Ringer para peixes.

3.6. - Aquisição da DOE

A DOE foi monitorada com auxílio de um osciloscópio Tektronix modelo 5111 (“Beaverton, OR, USA”) e capturada com uma taxa de aquisição de 10 KHz por um editor de áudio “Audacity” (versão 1.2.6.) instalado em um computador. O tempo total de cada aquisição foi de 35 minutos, iniciado 5 minutos antes das microinjeções das drogas ou de salina, e finalizado 30 minutos após as respectivas microinjeções.

3.7. - Análise dos dados e tratamento estatístico

Os valores instantâneos das frequências da DOE durante todo o experimento foram obtidos a partir de um contador de frequências que calculava o inverso do período entre dois pulsos, e os valores individuais da frequência instantânea da DOE, desenvolvido pelo Dr. João Kajiwara, e foram plotados em função do tempo. Os valores médios \pm erro padrão da média (EPM) das diversas variáveis presentes nas modulações da DOE produzidas pelas drogas também foram calculados e plotados em função do tempo e das concentrações. Para análise estatística, estes valores foram analisados por meio de uma análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) e as diferenças estatísticas foram determinadas pelo pós-teste de Tukey e Dunnett's, usando o programa “Sigma Stat” 2.03. Os gráficos foram construídos, usando os programas “Origin” 7 e “Corel Draw” 10.

3.8. - Avaliação dos padrões esqueléticos

O comportamento do animal antes e depois das microinjeções das drogas foi filmado por uma câmera acoplada a uma placa “Pixelview” que tinha capacidade para registrar 30 quadros/s.

Os padrões esquelotomotores, reconhecidos como respostas de orientação, foram analisados e plotados em função da sua ocorrência e duração durante as modulações da DOE.

3.9. - Grupos experimentais

Grupo 1: Microinjeções de bicuculina (0,245 mM) e salina (n = 6) no TeO e registro das respostas eletro e esquelotomotoras.

Grupo 2: Microinjeções de bicuculina (0,49 mM) e salina (n = 6) no TeO e registro das respostas eletro e esquelotomotoras.

Grupo 3: Microinjeções de bicuculina (0,98 mM) e salina (n = 6) no TeO e registro das respostas eletro e esquelotomotoras.

Grupo 4: Microinjeções de bicuculina (1,96 mM) e salina (n = 8) no TeO e registro das respostas eletro e esquelotomotoras.

Grupo 5: Microinjeções de bicuculina (0,98 mM), muscimol (15,35 mM) e três minutos após bicuculina (0,98 mM), apenas muscimol ou salina (n = 6) no TeO, feitas de forma alternada e em dias consecutivos e registro das respostas eletro e esquelotomotoras.

Grupo 6: Microinjeções intramusculares de uretana (2g/Kg) e após a parada dos batimentos operculares, microinjeções de bicuculina (0,98 mM) (n = 6) no TeO e registro das respostas eletromotoras.

Grupo 7: Microinjeções de NMDA (100 mM), AP-5 (100 mM) e salina (n = 6) no TeO feitas de forma alternada e em dias consecutivos e registro das respostas eletro e esquelotomotoras.

3.10. - Procedimentos histológicos

Ao término do experimento e após anestésiar o animal profundamente, um semi-microeletrodo metálico de aço (Frederick Haer & CO., Bowdoinham, ME, USA) foi aprofundado através da cânula-guia até o sítio da microinjeção. O eletrodo estava conectado ao anodo de uma fonte de corrente contínua para a realização de uma pequena lesão na extremidade exposta do eletrodo o que facilitou a posterior localização do sítio da microinjeção. A corrente empregada para a lesão foi de 1mA, durante 5 segundos. O eletrodo de referência foi colocado na cauda do animal.

O capacete de acrílico foi retirado e o animal sacrificado por anestesia profunda (MS222: Sandoz: 0,2 g/l). A cabeça foi destacada do corpo e mergulhada em solução de formalina a 10%. Posteriormente, o cérebro foi retirado da caixa craniana e submetido a processamento histológico. Depois de incluídos em parafina, cortados e corados com Cresil Violeta, os cortes foram observados ao microscópio óptico (“Zeiss”) ,e os sítios das microinjeções, reconhecidos.

3.11. - Determinação neuroanatômica das conexões do TeO de *Gymnotus carapo*

Os peixes mediam $23,4 \pm 2$ cm e pesavam $27,7 \pm 2,08$ g. Os cuidados com os animais, anestesia, cirurgia e eutanásia foram feitos de acordo com as normas do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e aprovados pela Comissão de ética em experimentação animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Processo n° 047/2003).

A amina de dextrana biotinizada (BDA; 3000 “MW”, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) é um traçador neuronal de baixo peso molecular que pode ser facilmente transportado nos sentidos retrógrado e anterógrado. Este composto enzimático é

constituído por uma dextrana, um polissacarídeo, cujo monômero é a glicose, que se liga à biotina, formando uma molécula que é facilmente captada pela membrana celular e transportada.

Após ser transportado, ligamos ao BDA o complexo Avidina Biotina conjugado a peroxidase (kit ABC Elite Vectastain ABC, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Para a visualização desse composto, realizamos uma reação de óxido-redução, utilizando cromogênio, cujo produto final possuía densa cor marrom escuro, tornando visível o sítio de injeção, os neurônios marcados retrogradamente bem como os campos terminais.

Os procedimentos usados desde a anestesia até a abertura da calota craniana foram os mesmos descritos na seção Anestesia do Experimento 1.

Para a injeção iontoforética, foram utilizadas micropipetas de vidro com 20-40 μm de diâmetro de ponta, preenchidas com a solução de BDA. Esta solução foi preparada por diluição de 10 mg de BDA em 100 μl de tampão fosfato a 0,01 M, com pH 7,4. A solução foi dividida em alíquotas de 5 e 10 μl , congeladas a -70°C e descongeladas (não mais que uma vez) quando necessárias.

As micropipetas foram acopladas ao micromanipulador da caixa de cirurgia já mencionada no Experimento 1 para serem posicionadas no local desejado. O traçador foi injetado iontoforéticamente, durante 10 minutos, com o uso de pulsos alternados (5s “on” / 5s “off”) de correntes positivas de 5 μA , liberados por uma fonte, à qual estavam conectados o eletrodo inserido no líquido da micropipeta, e o fio terra colocado sob a pele que recobre a cabeça do animal.

Os animais foram mantidos em aquários individuais por 5-8 dias para o transporte do traçador. Após este período, foram profundamente anestesiados por imersão em

solução de MS222 e perfundidos através do coração com Ringer (50 ml) seguido por solução de paraformaldeído a 4 %, em tampão fosfato a 0,1 M (pH 7,4) (50 ml).

Os cérebros foram removidos da caixa craniana e armazenados no mesmo fixador a 4 °C, por 24 horas e, posteriormente, mantidos em tampão fosfato a 0,1 M com pH 7,4, durante 4 horas. Foram, em seguida, imersos em solução de gelatina a 18 % dissolvida em tampão fosfato a 0,1 M (pH 7,4), e mantidos a 4°C por 20 minutos. Secções frontais com espessura de 80 µm foram realizadas ao vibrátomo (“Vibratome 1000, Oxford, St. Louis, MO, USA”) e imersas em tampão fosfato a 0,1 M (pH 7,4). Antes do procedimento histoquímico de revelação do BDA, o excesso de gelatina foi removido por lavagem dos cortes em tampão fosfato a 0,1 M (pH 7,4), aquecido a 35°C.

Para o processamento, os cortes foram imersos em etanol às concentrações de 50, 70 e 50%, durante 15, 20 e 15 minutos, respectivamente, para eliminar a atividade de peroxidases endógenas das células sanguíneas, que podiam competir com o traçador e dificultar a análise das regiões marcadas. Seguindo esse processo de pré-clareamento, os cortes foram lavados três vezes em tampão fosfato a 0,1 M com pH 7,4, durante 10 min e incubados em solução ABC durante uma hora, sob agitação, e à temperatura ambiente.

A solução ABC é um complexo avidina-biotina-HRP, preparada com 100 µl de A (avidina) e 100 µl de B (HRP biotinizada) em 10 ml de tampão fosfato a 0,1 M (pH 7,4) e armazenada por 40 minutos. Em seguida, os cortes foram lavados três vezes em tampão fosfato a 0,1 M (pH 7,4), durante 10 minutos, e incubados para a visualização da peroxidase, usando como cromogênio o di-hidroclorato de diaminobenzidina (DAB).

A incubação foi realizada durante 10 minutos, sob agitação a 4°C, em local com pouca luminosidade, em uma solução contendo DAB (50 mg), cloreto de cobalto

($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2,5 ml) e sulfato de níquel amoniacal [$(\text{NH}_4)_2\text{Ni}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2,0 ml] em tampão fosfato a 0,1 M (pH 7,4, 100 ml). Em seguida, água oxigenada (H_2O_2) foi adicionada a uma concentração final de 0,001%. A reação se conduziu por 5 a 20 minutos, dependendo da intensidade da marcação e foi interrompida por lavagens em tampão fosfato a 0,1 M (pH 7,4), por pelo menos três vezes.

Os cortes foram montados em lâminas de vidro gelatinizadas. As secções foram contracoradas com Cresil Violeta e analisadas sob fotomicroscópio (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

A identificação das regiões anatômicas do cérebro de *Gymnotus carapo* foi baseada em comparações com estudo do cérebro de *Apteronotus leptorhynchus* (MALER; SAS; ELLIS, 1991). As imagens foram captadas, utilizando-se microscópio AXIOPHOT (Carl Zeiss) e processadas mediante o uso dos programas “Adobe Photoshop” 5 (ajuste de brilho e contraste) e “Corel Draw 10”.

4 – Resultados

4.1- Efeitos eletro e esquetomotores decorrentes da interferência farmacológica em receptores GABAérgicos do TeO de *Gymnotus carapo*.

4.1.1- Efeitos eletromotores

Para avaliar o envolvimento dos receptores GABA_A na modulação da DOE foram efetuadas, nas camadas intermediárias e profundas do TeO, microinjeções de diferentes concentrações do antagonista GABA_A, bicuculina (0,245 mM; 0,49 mM; 0,98 mM e 1,96 mM), assim como do agonista GABA_A, muscimol (15,35 mM). O mesmo volume (0,1 µl) de salina foi microinjetado, como controle.

Grupo 1:

Microinjeções de 0,245 mM de bicuculina ou salina (n = 6) não provocaram alterações na frequência da DOE (Figura 1).

Grupo 2:

Microinjeções de 0,49 mM de bicuculina (n = 6) induziram episódios de aumentos na frequência da DOE (Figura 2) que ocorriam frequentemente (5 ± 1 por minuto) $93,7 \pm 17,4$ s após as microinjeções e que se estendiam até 5 minutos. Este tipo de modulação da DOE era caracterizado por um aumento abrupto na frequência (AF) ($0,47 \pm 0,1$ s) seguido por uma fase estacionária (“plateau”) muito breve ($0,25 \pm 0,03$ s), durante a qual a frequência da descarga pelo menos dobrava ($136,89 \pm 7,25$ Hz) seu valor basal ($54,18 \pm 2,69$ Hz). Essa fase de plateau era sucedida por uma de retorno da frequência para o seu valor basal (RF) ($4,41 \pm 0,49$ s). As microinjeções de salina não interferiram nos valores instantâneos da frequência da descarga (Fig. 2).

Grupo 3:

Microinjeções de 0,98 mM de bicuculina ($n = 8$) induziram episódios de aumentos na frequência da DOE (Figura 3A e B) que ocorriam frequentemente ($6,91 \pm 0,77$ por minuto) $52,33 \pm 22,77$ s após as microinjeções, estendendo-se até 20 minutos. Este tipo de modulação da DOE era caracterizado por um aumento abrupto na frequência (AF) ($0,3 \pm 0,03$ s) seguido por uma fase estacionária (plateau) muito breve ($0,2 \pm 0,02$ s), durante a qual a frequência da descarga pelo menos dobrava ($126,05 \pm 3,95$ Hz) seu valor basal ($53,15 \pm 0,46$ Hz). Essa fase de plateau era sucedida por uma de retorno da frequência para o seu valor basal (RF) ($3,1 \pm 0,24$ s). As microinjeções de salina não interferiram nos valores instantâneos da frequência da descarga (Fig. 3A).

Grupo 4:

Microinjeções de 1,96 mM de bicuculina ($n = 6$) induziram episódios de aumentos na frequência da DOE (Figura 4A, B e C) que ocorriam com bastante frequência ($29,2 \pm 2,29$ por minuto) $34,7 \pm 13,50$ s após as microinjeções e estendendo-se até 20 minutos. Após as microinjeções, os episódios se caracterizavam por aumentos rápidos na frequência ($0,35 \pm 0,08$ s) seguidos por uma fase estacionária (plateau) muito breve ($0,21 \pm 0,03$ s) durante o qual a frequência da descarga pelo menos dobrava ($125,63 \pm 2,87$ Hz) seu valor basal ($57,82 \pm 1,77$). Esta fase de plateau era intercalada por períodos breves ($2,52 \pm 0,3$ s) de aumentos menores na frequência ($75 \pm 4,6$ Hz) (Figura 4A, B e C) que, dessa maneira, não retornava rapidamente para seu valor basal ($18,16 \pm 5,62$ s) (Figura 4B). As microinjeções de salina não interferiram nos valores instantâneos da frequência da descarga (Figura 4A).

Após as microinjeções de 1,96 mM de bicuculina, os episódios de aumentos na frequência da descarga eram mais frequentes ($29,2 \pm 2,29$) do que aqueles produzidos

pelas concentrações de 0,98 mM ($6,91 \pm 0,77$) e 0,49 mM (5 ± 1) ($P < 0,05$, ANOVA medidas repetidas seguido pelo teste Tukey) (Figura 5A). Estes episódios ocorriam mais rapidamente após as microinjeções de 1,96 mM de bicuculina ($34,7 \pm 13,5$ s) do que aqueles observados após as microinjeções de 0,49 mM ($93,7 \pm 17,4$) ($P < 0,05$, ANOVA medidas repetidas seguido pelo teste Tukey) (Figura 5B). Quando cada fase dos episódios de aumento na frequência da DOE produzidos pelas diferentes concentrações de bicuculina foram comparadas, apenas a fase de retorno para o valor basal após as microinjeções de 1,96 mM ($18,16 \pm 5,62$ s) era estatisticamente diferente quando comparada com aquelas produzidas pelas microinjeções de 0,98 mM ($3,1 \pm 0,24$ s) e 0,49 mM ($4,41 \pm 0,49$) (Figura 5C) ($P < 0,05$, ANOVA medidas repetidas seguido pelo teste Tukey).

Grupo 5:

As microinjeções de 15,35 mM de muscimol 15,35 mM assim como de salina ($n = 6$) não interferiram nos valores instantâneos da frequência da descarga (Figura 6A e B). Porém o pré-tratamento com microinjeções de 15,35 mM de muscimol no TeO bloqueou os efeitos produzidos pelas microinjeções de 0,98 mM de bicuculina nesta mesma estrutura (Figura 6B).

Grupo 6:

Como nos experimentos acima a movimentação do animal na caixa experimental podia gerar modulações nas amplitudes dos pulsos da DOE devido ao distanciamento dos eletrodos fixos (Fig. 7A). Neste experimento os animais ($n = 6$) foram anestesiados com uretana (2g/Kg) e contidos na caixa experimental. Nessas condições, as microinjeções de 0,98 mM de bicuculina também provocaram os aumentos na frequência da descarga sem modulações da amplitude dos pulsos da descarga (Figura 7B).

4.1.2- Efeitos esquelomotores

Grupo 1:

As microinjeções de 0,245 mM de bicuculina ou salina no TeO não provocaram respostas esquelomotoras.

Grupo 2:

As microinjeções de 0,49 mM de bicuculina no TeO eliciaram respostas esquelomotoras no decorrer das quais os animais exibiram: movimentos súbitos e bruscos de natação para frente; movimentos do tipo sacádicos (rápidos) com a cabeça de um lado para outro; movimentos de natação com a cabeça um pouco inclinada para baixo, fazendo com que a região onde se situa a maioria dos eletorreceptores rostrais ficasse apontada para cima; mudanças de postura; movimentos de ondulações do corpo e das nadadeiras. Essas respostas ocorriam logo após as microinjeções da bicuculina e persistiam até 5 minutos. Nestes experimentos, foi possível observar que os padrões esquelomotores ocorriam juntos com os aumentos na frequência da DOE e em alguns dos aumentos na frequência da descarga analisados ($n = 12$), correlações positivas foram encontradas entre sua duração (AF + Plateau + RF) e a ocorrência dos padrões esquelomotores (análise de regressão linear, $r^2 = 0,89$; $P < 0,0001$) (Figura 8A). Nenhuma alteração esquelomotora foi observada após as microinjeções de salina.

Grupo 3:

Microinjeções de 0,98 mM de bicuculina eliciaram respostas esquelomotoras moderadas no decorrer das quais os animais exibiram os mesmos tipos de padrões esquelomotores apresentados após a microinjeção de 0,49 mM de bicuculina. Essas respostas ocorriam logo após as microinjeções da bicuculina e persistiam até 20

minutos. Nestes experimentos foi possível observar que os padrões esquelomotores ocorriam juntos com os aumentos na frequência da DOE e, em alguns dos aumentos na frequência da descarga analisados ($n = 22$), correlações positivas foram encontradas entre sua duração (AF + Plateau + RF) e a ocorrência dos padrões esquelomotores. Nestes experimentos, durante os aumentos mais duradouros na frequência da descarga, mais padrões motores eram realizados (análise de regressão linear, $r^2 = 0,81$; $P < 0,0001$) (Figura 8B). Nenhuma alteração esquelomotora foi observada após as microinjeções de salina.

Grupo 4:

A microinjeção de 1,96 mM de bicuculina no TeO também eliciu respostas esquelomotoras similares àqueles observados após a microinjeção de 0,98 mM de bicuculina. Nestes experimentos, tais padrões esquelomotores ocorriam até 20 minutos após as microinjeções e foi possível também encontrar uma correlação positiva entre a sua ocorrência e a duração dos aumentos na frequência da DOE (análise de regressão linear, $r^2 = 0,91$; $P < 0,0001$) (Figura 8C). Nenhuma alteração esquelomotora foi observada após as microinjeções de salina.

4.2- Efeitos eletro e esquelomotores decorrentes da interferência farmacológica em receptores Glutamatérgicos do TeO em *Gymnotus carapo*.

4.2.1- Efeitos eletromotores

Para avaliar o envolvimento dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA na modulação da DOE foram efetuadas, nas camadas intermediárias e profundas do TeO, microinjeções do agonista NMDA (100 mM) e do seu antagonista AP-5 (100 mM). O mesmo volume (0,1 μ l) de salina foi microinjetado como controle.

Grupo 7:

Microinjeções de 100 mM de NMDA ($n = 6$) induziram episódios de aumentos na frequência da DOE (Figura 9A e B) que ocorriam com pouca frequência ($1,9 \pm 0,21$ por minuto) $92,61 \pm 21,36$ s após as microinjeções e que se estendiam até os 5 minutos. Este tipo de modulação da DOE era caracterizado por uma fase longa ($85,8 \pm 0,02$ s) de aumentos menores na frequência da descarga ($78,6 \pm 6,2$ Hz) que se mantinha num valor mais elevado que o valor basal ($68,96 \pm 0,27$) (Figura 9A). Durante esta fase, ocorriam aumentos maiores na frequência da DOE, que pelo menos dobrava ($135,13 \pm 19,29$ Hz) seu valor basal (Figura 9B).

As microinjeções de 100 mM de AP-5 assim como de salina não interferiram nos valores instantâneos da frequência da descarga (Figura 9A).

4.2.2- Efeitos esquelomotores

Microinjeções de 100 mM NMDA eliciaram poucas respostas esquelomotoras no decorrer da qual os animais exibiram: movimentos de natação, ligeira perda postural, movimentos de ondulações das nadadeiras. Essas respostas ocorriam logo após as microinjeções do NMDA e persistiam até 5 minutos. Durante esses experimentos, foi possível observar que esses padrões esquelomotores ocorriam juntos com os aumentos na frequência da DOE e em alguns dos aumentos na frequência da descarga analisados ($n = 8$), correlações positivas foram encontradas entre sua duração (AF + Plateau + RF) e a ocorrência dos padrões esquelomotores (análise de regressão linear, $r^2 = 0,81$; $P < 0,0001$) (Figura 8D). Nenhuma alteração esquelomotoras foi observada após as microinjeções de 100 mM de AP-5 ou salina.

4.3- Histologia

Neste estudo foram utilizados somente os peixes cujos pontos das microinjeções no TeO foram histologicamente confirmados. A figura 10 é uma fotomicrografia de uma secção frontal do mesencéfalo de *Gymnotus carapo* mostrando um sítio típico da microinjeção na região mediodorsal do TeO, nas camadas mediais.

4.4- Determinação por técnica de rastreamento, das possíveis vias envolvidas nos efeitos eletro e esqueletomotores observados após as microinjeções de bicuculina e NMDA no TeO de *Gymnotus carapo*.

Em oito animais, os depósitos de BDA foram feitos por iontoforese, unilateralmente, na margem mediodorsal do TeO em planos coincidentes com o conjunto de fibras que compõe o eTS (Figura 11A). A presença de fibras e corpos celulares preenchidos nas três zonas mostra que a deposição do traçador abrange as camadas contidas nas mesmas. Na SGC foi possível observar neurônios bipolares do tipo piramidal, assim como neurônios monopolares do tipo piriforme com axônios grossos que se estendem em direção a SFGS (Figura 11B). Na SAC observamos neurônios monopolares do tipo piriforme (Figura 11C) e na SPV, neurônios monopolares ovóides ou piriformes (Figura 11D).

Após a aplicação do traçador no TeO, neurônios retrogradamente marcados foram observados na região dorsocentral do telencéfalo dorsal (Dc) ipsi (Figura 12A) e contralateral ao sítio da injeção iontoforética. Também foi possível observar fibras marcadas na porção medial do quiasma óptico (OC) ipsilateral (Figura 12B).

Na região do tálamo dorsal, fibras e terminais foram observados na região lateral do complexo CP/PPn ipsilateral (Figura 13A e B). Essas fibras saem do TeO, passam pela região medial do núcleo eletrossensorial (nE), pela borda inferior do núcleo

pretectal e caminham numa posição medial do diencéfalo até chegarem ao complexo pela sua borda caudo-lateral (Figura 13B).

Na região mais caudal do tálamo dorsal, foi possível observar neurônios, fibras e terminais marcados no núcleo tegmental mesencefálico rostral (RMT) bilateral (Figura 14A e B). A partir do ponto de injeção, é possível observar fibras que deixam o TeO e penetram na região medial do trato tectobulbar (tTB). Ao nível da área reticular intersticial, essas fibras deixam este trato, contornam este núcleo pela sua borda dorsolateral e dirigem-se horizontalmente até chegar à região medial do RMT.

Em planos mais caudais da porção ventrolateral do mesencéfalo, neurônios, fibras e terminais foram encontrados nas diversas camadas do TSd ipsilateral. As fibras deixam o teto, passam pelos eferentes do toro semicircular (eTS), área reticular mesencefálica lateral (LMRA) e daí penetram pela camada mais profunda do TSd (IX) de onde ascendem em direção às camadas VIII e V.

Na camada IX do TSd, foi possível observar, além destas fibras verticais ascendentes, neurônios retrogradamente marcados (Figura 15A). Terminais e neurônios também foram marcados nas camadas VIIID (Figura 15A), VIIIA e VIIIB (Figura 15B). Na camada V do toro, vêem-se apenas neurônios marcados (Figura 15C).

No rombencéfalo, fibras, neurônios e terminais foram marcados na região da coluna medial da formação reticular (FR), núcleo médio ipsi e contralateral (Figura 16A e B). As fibras saem do TeO e incorporam-se ao tTB seguindo uma trajetória lateral. Na região da decussação do lemnisco (dLL), essas fibras ascendem em direção à FR e terminam na coluna medial. Nesta mesma região, fibras também foram observadas transitando pela região do fascículo longitudinal medial (FLM) (Figura 16C).

Na medula espinhal, foi possível observar fibras na região do funículo ventral (fv) contralateral (Figura 16D). Em sua trajetória descendente, estas fibras cruzam a linha média na altura do RMT, e, mais caudalmente, é possível observá-las junto ao trato espinal (tSP) por onde trafegam até chegarem na região lateral do fv.

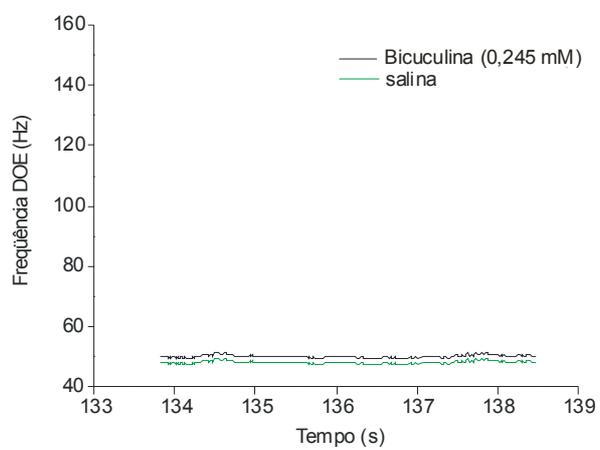


Figura 1. Valores instantâneos das frequências da DOE após microinjeções de 0,245 mM de bicuculina e salina nas camadas intermediárias e profundas do TeO de *Gymnotus carapo*.

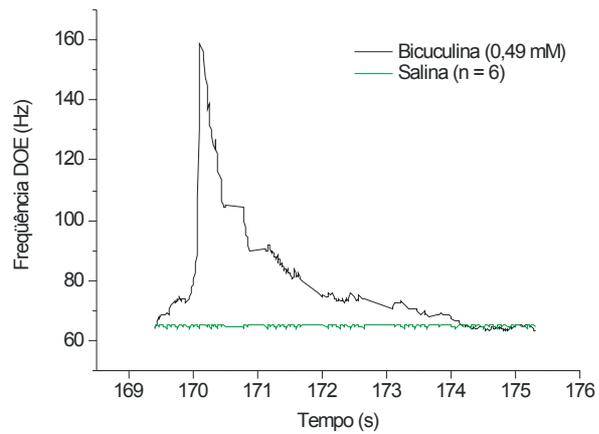


Figura 2. Um episódio característico de aumento na frequência instantânea da DOE após a microinjeção de 0,49 mM de bicuculina nas camadas intermediárias e profundas do TeO de um exemplar de *Gymnotus carapo* representativo do grupo. As microinjeções de salina nestas mesmas camadas do teto não provocaram alterações na descarga.

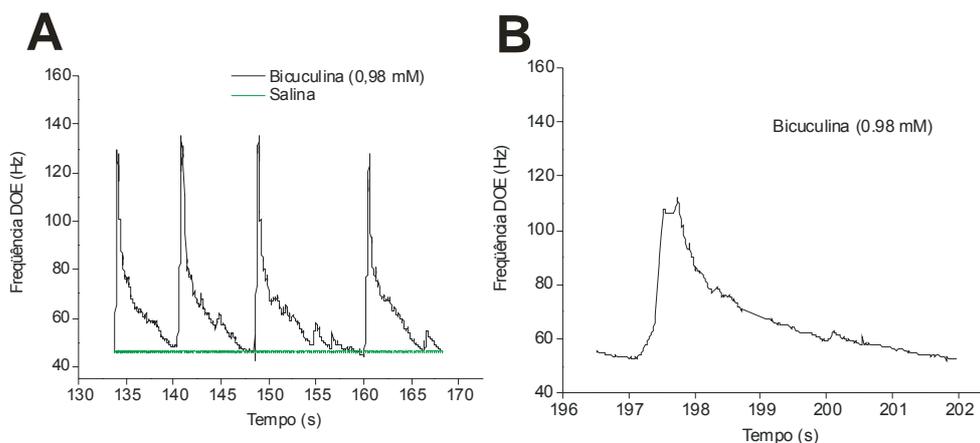


Figura 3 A-B. Registros dos valores instantâneos na frequência da DOE (Hz) num exemplar de *Gymnotus carapo* representativo do grupo. **A)** Exemplos de episódios sequenciais de aumentos da descarga do OE após microinjeções de 0,98 mM de bicuculina e salina nas camadas intermediárias e profundas do TeO. **B)** Exemplo de um episódio expandido temporalmente para mostrar os componentes da resposta: aumento abrupto na frequência da DOE (AF) seguido por uma fase estacionária na qual a frequência da DOE pelo menos dobra seu valor basal (“plateau”) e uma fase de retorno gradual da frequência para o valor basal (RF).

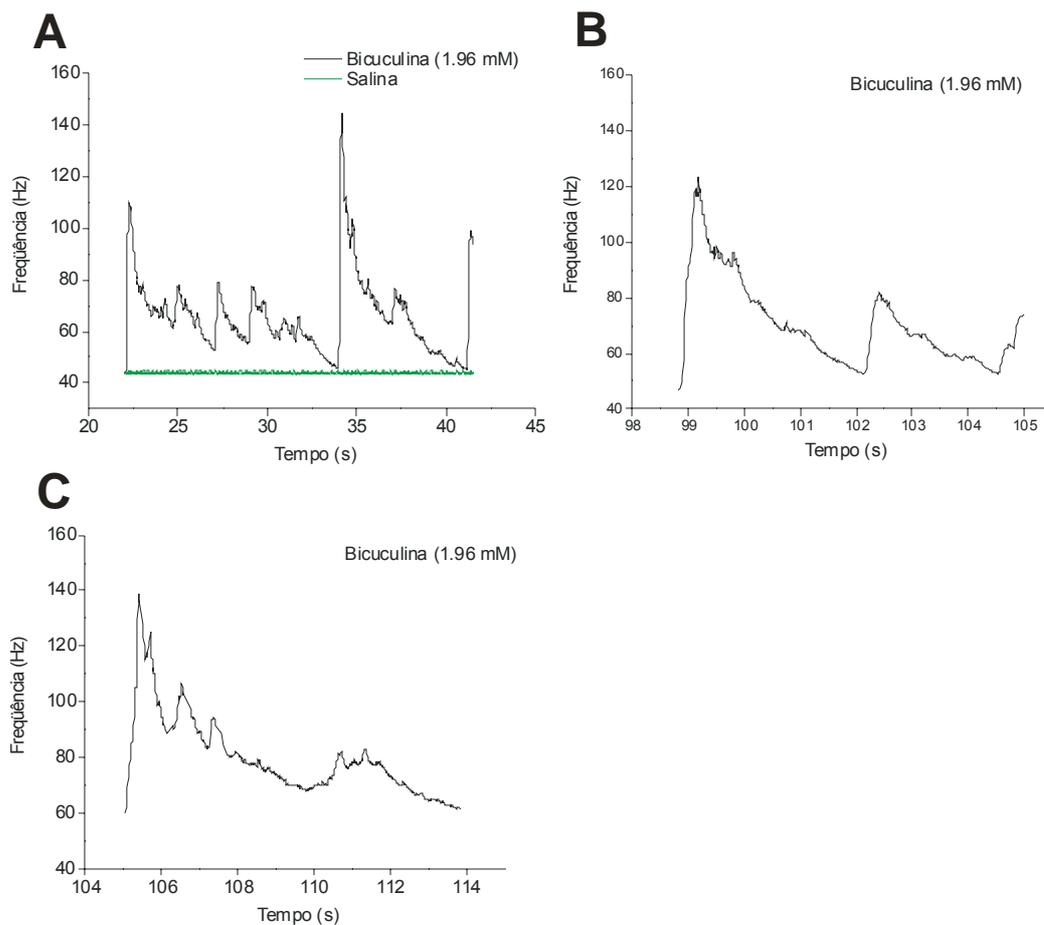


Figura 4 A-C. Registros dos valores instantâneos na frequência da DOE (Hz) num exemplar de *Gymnotus carapo* representativo do grupo. **A)** Variação temporal dos valores instantâneos das frequências da descarga após microinjeções de 1,96 mM de bicuculina e salina nas camadas intermediárias e profundas do TeO. **B)** Dois episódios característicos dos aumentos na frequência da DOE após microinjeções de bicuculina no TeO. **C)** Variação temporal dos valores instantâneos das frequências da descarga após microinjeções de bicuculina no TeO. Nestes gráficos é possível observar que a fase de plateau é intercalada por períodos breves de aumentos menores na frequência da DOE que desta maneira não retorna rapidamente para seu valor basal.

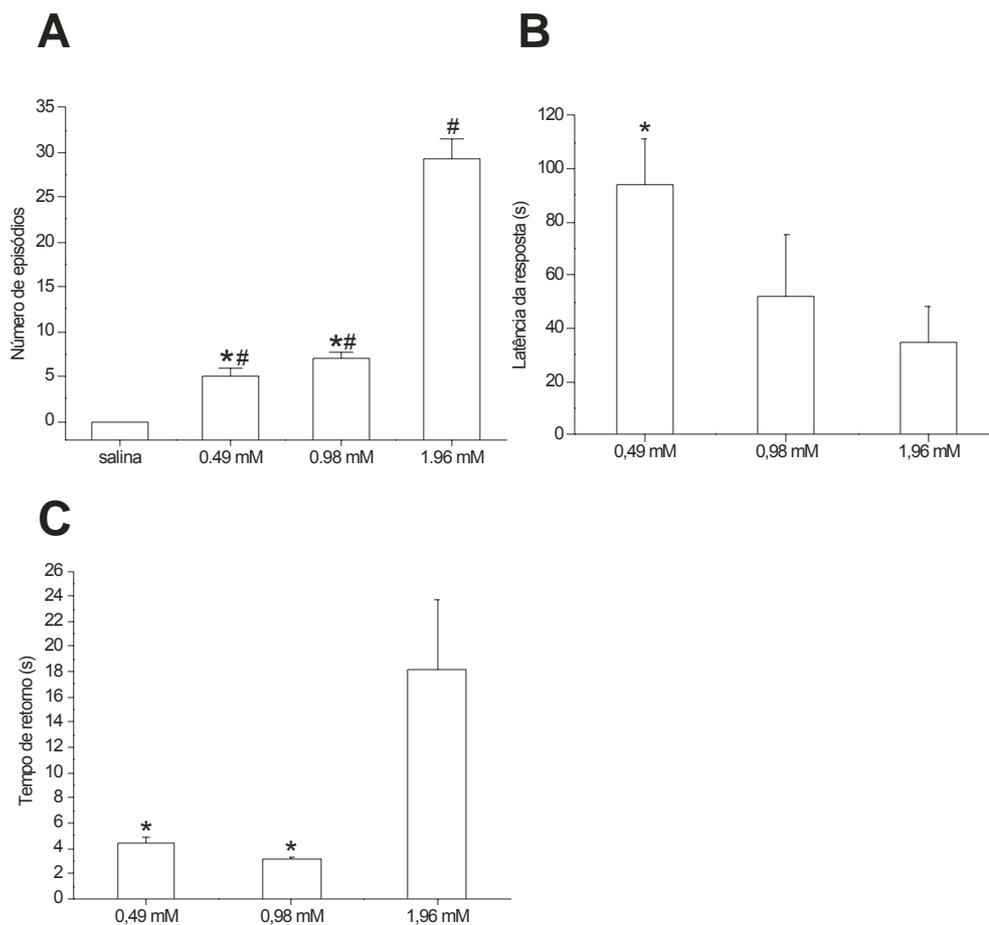


Figura 5. A-C. Alterações na DOE causadas pela microinjeção de 3 concentrações de bicuculina (0,49 mM; 0,98 mM e 1,96 mM) nas camadas intermediárias e profundas do TeO de *Gymnotus carapo*. **A)** Número médio de episódios de aumentos na freqüência da DOE no período de 1 min. **B)** Latência média (em segundos) para a ocorrência do primeiro episódio de aumentos na freqüência da DOE. **C)** Tempo médio para o retorno (em segundos) da freqüência ao valor basal. (#) valores estatisticamente significantes quando comparados com a salina ($P < 0,05$, ANOVA medidas repetidas seguido pelo teste Dunnett's). (*) valores estatisticamente significantes quando comparados com aqueles produzidos por 1,96 mM ($P < 0,05$, ANOVA medidas repetidas seguido pelo teste Tukey). As barras verticais representam o Erro Padrão da Média (EPM).

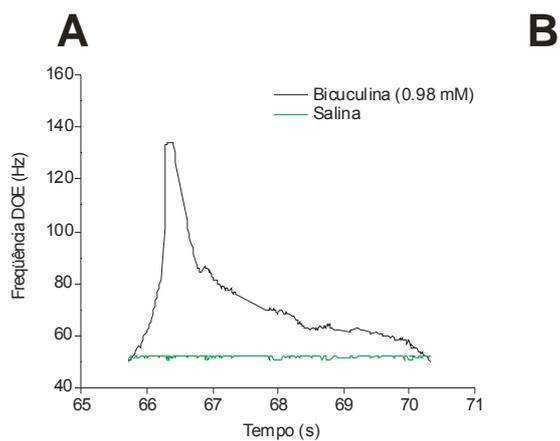


Figura 6 A-B. Registros dos valores instantâneos na frequência da DOE (Hz) num exemplar de *Gymnotus carapo* representativo do grupo. **A)** Variação temporal dos valores instantâneos das frequências da descarga após microinjeções de 0,98 mM de bicuculina e salina nas camadas intermediárias e profundas do TeO. **B)** Variação temporal dos valores instantâneos das frequências da descarga após microinjeções de 0,98 mM de bicuculina, muscimol (15,35 mM) e bicuculina após o pré-tratamento com muscimol nas camadas intermediárias e profundas do TeO.

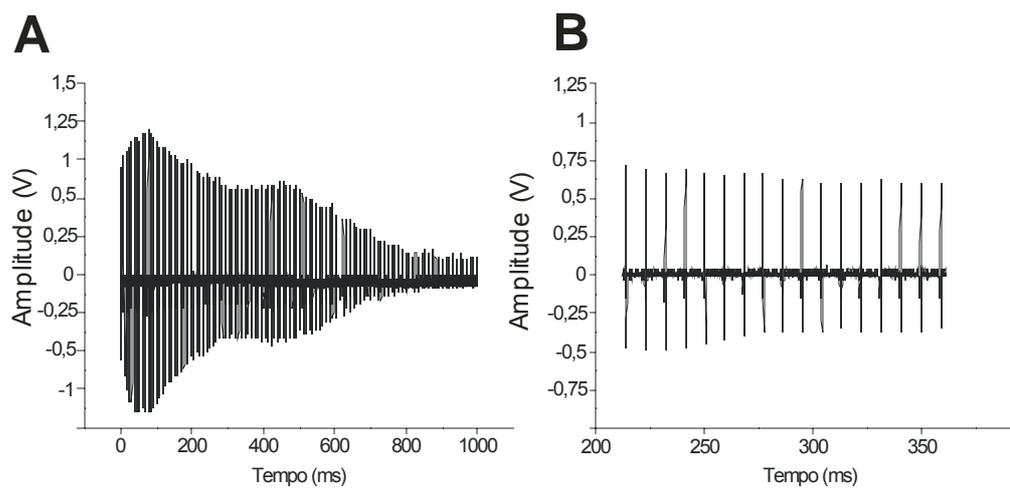


Figura 7. A-B. Exemplo de um registro digital da DOE após a microinjeção de 0,98 mM de bicuculina nas camadas intermediárias e profundas do TeO de um exemplar de *Gymnotus carapo*. **A)** não anestesiado e **(B)** anestesiado com uretana (2g/kg i.m.)

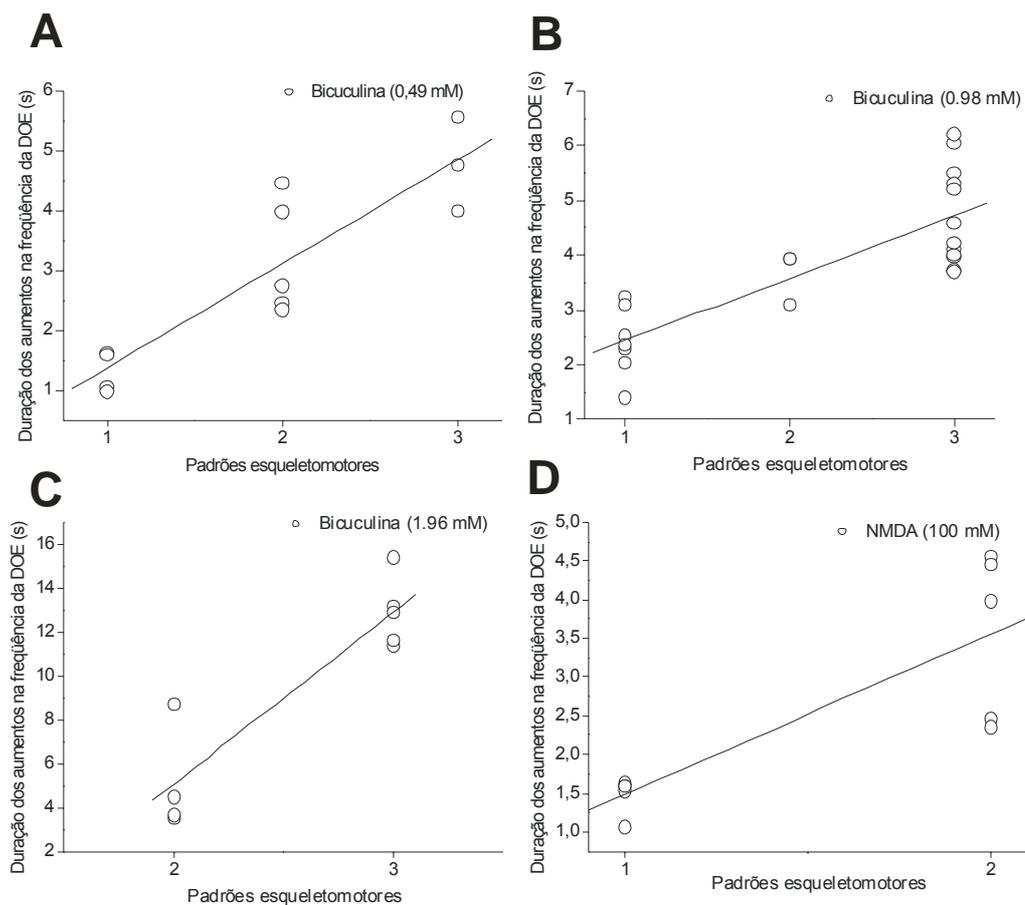


Figura 8 A-C. Duração total dos episódios de aumentos na frequência da DOE plotados em função do número de padrões esqueléticos após as microinjeções de drogas nas camadas intermediárias e profundas do TeO. **A)** Microinjeções de 0,49 mM de bicuculina. **B)** Microinjeções de 0,98 mM de bicuculina. **C)** Microinjeções de 1,96 mM de bicuculina. **D)** Microinjeções de 100 mM de NMDA. Entre os aumentos analisados foi possível encontrar uma correlação positiva entre a duração dos aumentos na frequência da DOE e a ocorrência dos padrões esqueléticos. $R^2 =$ em A, 0,81 em B, 0,91 em C e 0,81 em D. $P < 0,0001$.

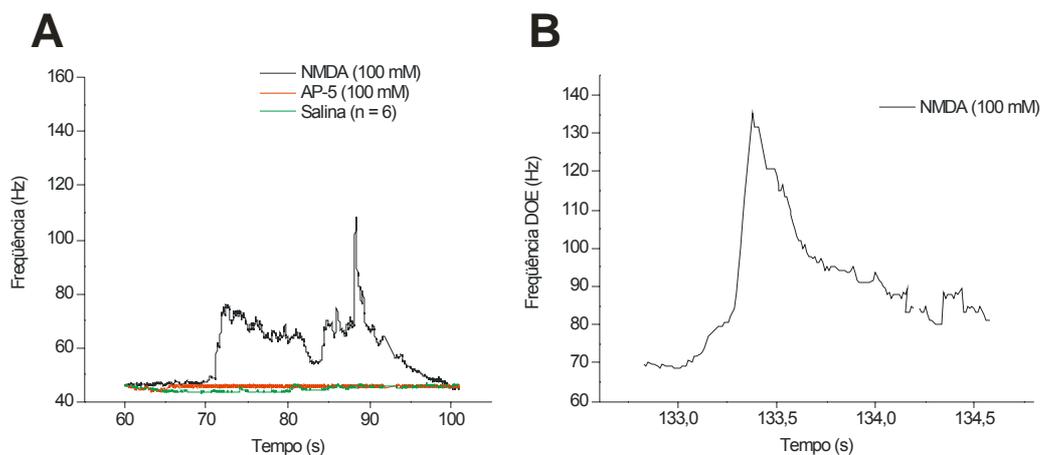


Figura 9. A-B. Variações instantâneas na frequência da DOE (Hz) num exemplar de *Gymnotus carapo* representativo do grupo. **A)** Variação temporal dos valores instantâneos das frequências da DOE após microinjeções de 100 mM de NMDA, 100 mM de AP-5 nas camadas intermediárias e profundas do TeO. **B)** Um episódio característico de um aumento na frequência da DOE após a microinjeção de NMDA no TeO.

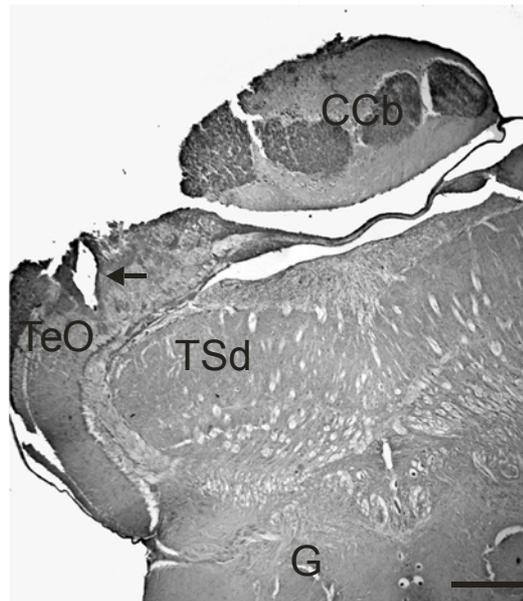


Figura 10. Fotomicrografia de uma secção frontal do mesencéfalo de um peixe representativo do grupo mostrando a localização da lesão eletrolítica indicativa do sítio da microinjeção no TeO (seta). Escala = 500 μ m. .

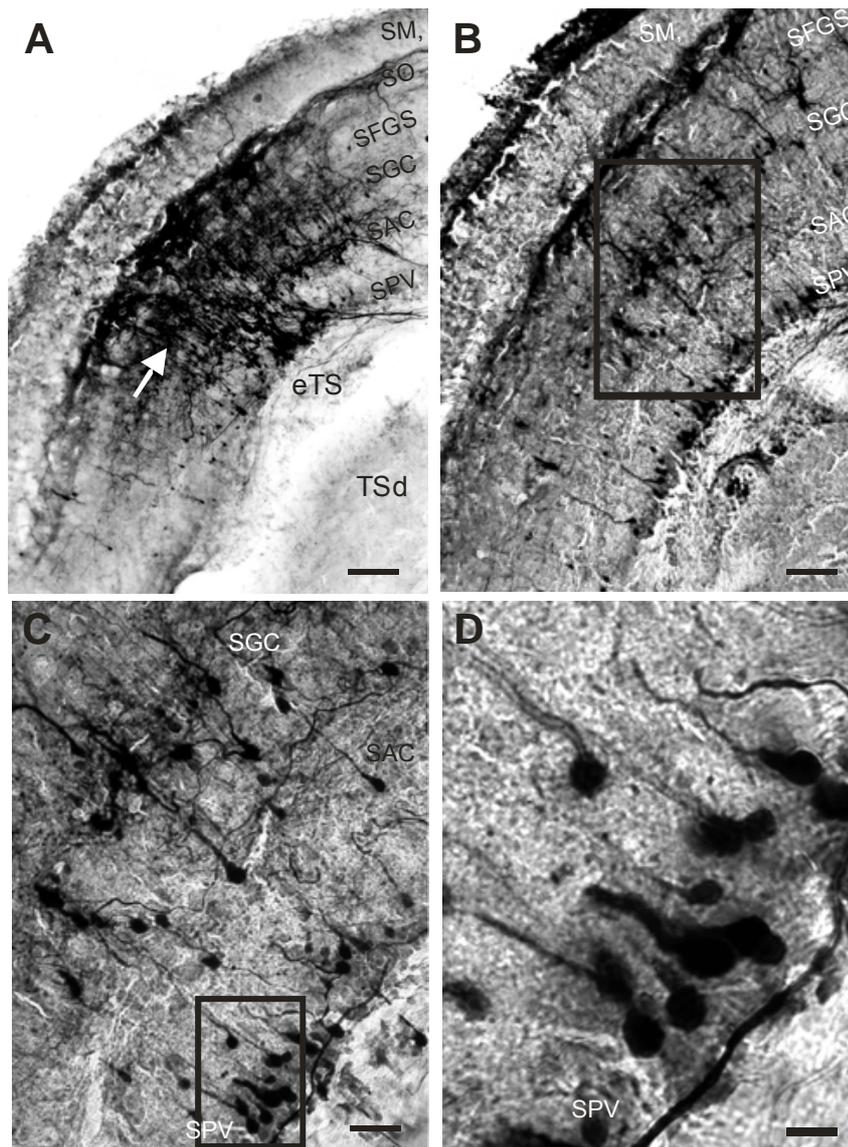


Figura 11. **A)** Deposição unilateral de dextrana amina biotinizada (BDA) (seta) na margem mediodorsal do teto óptico (TeO) num plano coincidente com o conjunto de fibras que compõe os eferentes do toro semicircular (eTS). **B)** Diferentes tipos neuroniais marcados na camada SGC do TeO. **C)** Diferentes tipos neuroniais marcados nas camadas SGC, SAC e SPV do TeO. **D)** Maior ampliação de C mostrando os neurônios marcados na camada SPV do TeO. Barras = 150 μ m em A, 50 μ m em B, 100 μ m em C e 25 μ m em D.

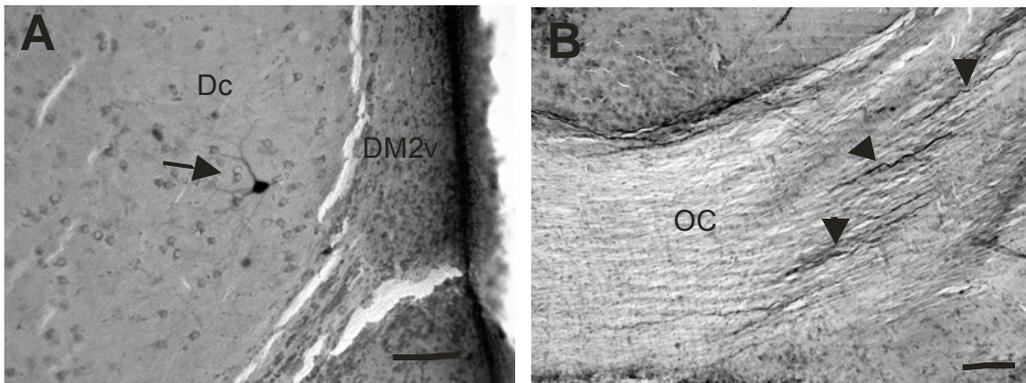


Figura 12. A) Neurônio (seta) retrogradamente marcado na região dorsocentral do telencéfalo dorsal (Dc) ipsilateral após o depósito do traçador no TeO . **B)** Fibras (pontas de setas) marcadas na região medial do quiasma óptico (OC) após o depósito do BDA no TeO ipsilateral. Barras = 50 μ m em A e B.

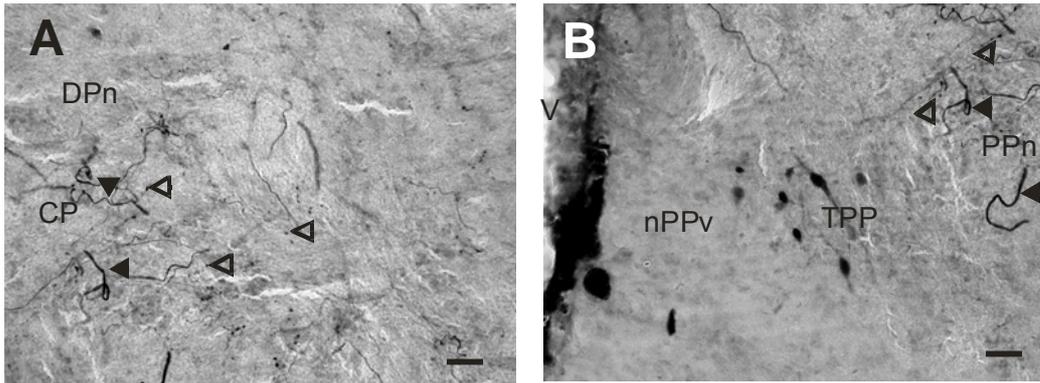


Figura 13. Fibras (pontas de setas) e terminais (pontas de setas abertas) marcados na região lateral do complexo CP/PPn ipsilateral após o depósito do traçador no TeO. **A)** Fibras (pontas de setas) e terminais (pontas de setas abertas) marcados na região rostral do complexo CP/PPn, onde se encontra o CP. **B)** Fibras (pontas de setas) e terminais (pontas de setas abertas) marcados na região caudal do complexo, onde se encontra o PPn. Barra = 25 μ m em A e B.

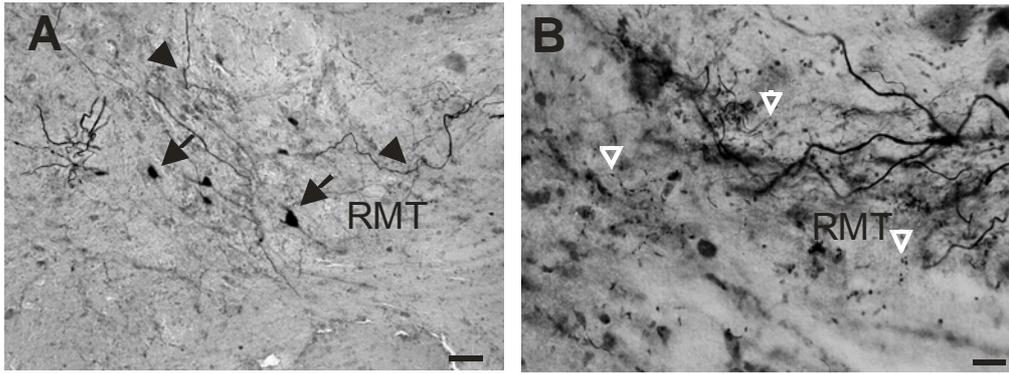


Figura 14. A) Neurônios (setas) e fibras (pontas de setas) marcados na região medial do núcleo tegmental mesencefálico rostral (RMT) contralateral após o depósito do BDA no TeO. **B)** Varicosidades sugerindo botões terminais (pontas de setas abertas) na região medial do RMT contralateral após o depósito do BDA no TeO. Barras = 25 μ m em A e B.

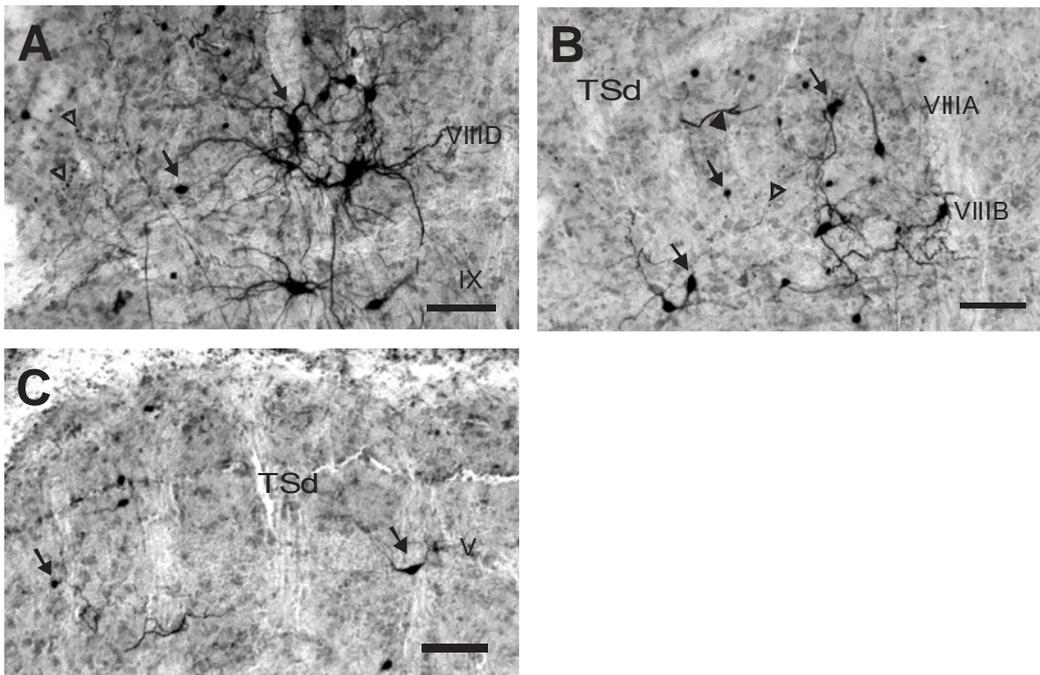


Figura 15. Neurônios (setas) e terminais (pontas de setas abertas) marcados no toro semicircular dorsal (TSd) ipsilateral após o depósito do BDA no TeO. **A)** Neurônios (setas), fibras (pontas de setas) e terminais (pontas de setas abertas) marcados nas camadas VIID e IX. **B)** Neurônios (setas) e terminais (pontas de setas abertas) marcados nas camadas VIIIA e VIIIB. **C)** Neurônios (setas) retrogradamente marcados na camada V. Barras = 50 μm em A, B e C.

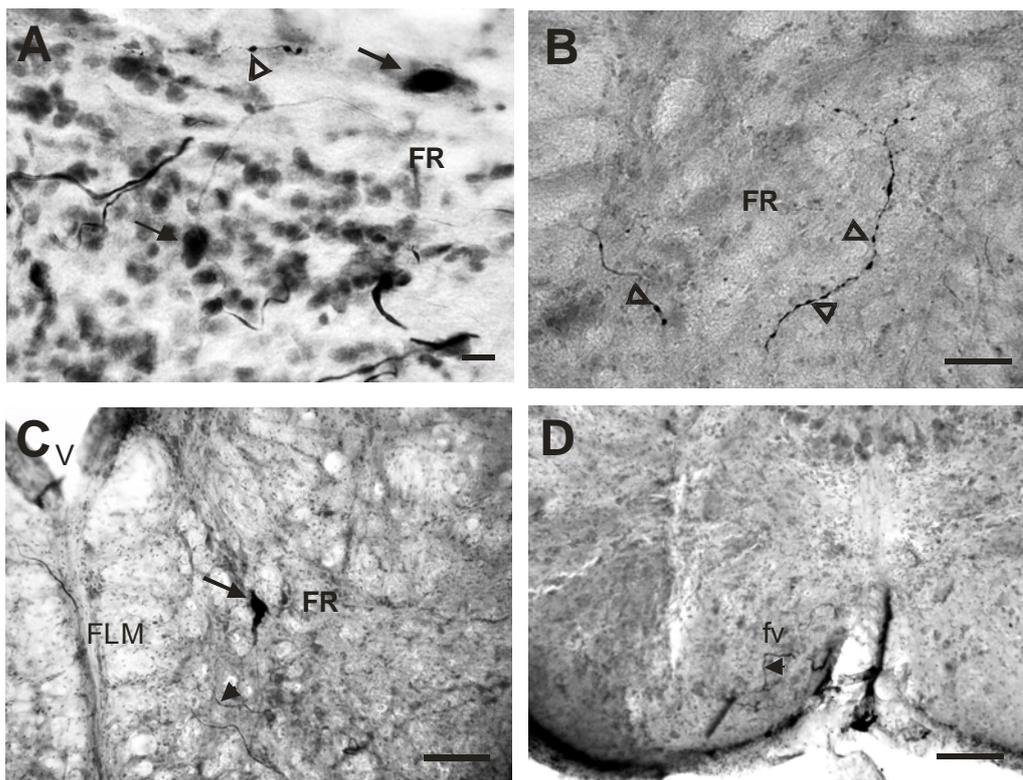


Figura 16. **A)** Neurônios (setas) e varicosidade (ponta de seta aberta) marcados na região da coluna medial da formação reticular (FR) ipsilateral, núcleo médio após o depósito do BDA no TeO. **B)** Varicosidades (pontas de setas abertas) marcadas na região da coluna medial da FR contralateral após o depósito do traçador no TeO. **C)** Neurônio (seta) e fibras (ponta de seta) marcados na coluna medial da FR ipsilateral após o depósito do BDA no TeO. Neste corte é possível observar também fibras marcadas no fascículo longitudinal medial (FLM). **D)** Fibras (ponta de seta) marcadas na região do funículo ventral (fv) ipsilateral da medula espinhal após o depósito do traçador no TeO. Barras = 20 μ m em A, 15 μ m em B, 20 μ m em C e 15 μ m em D.

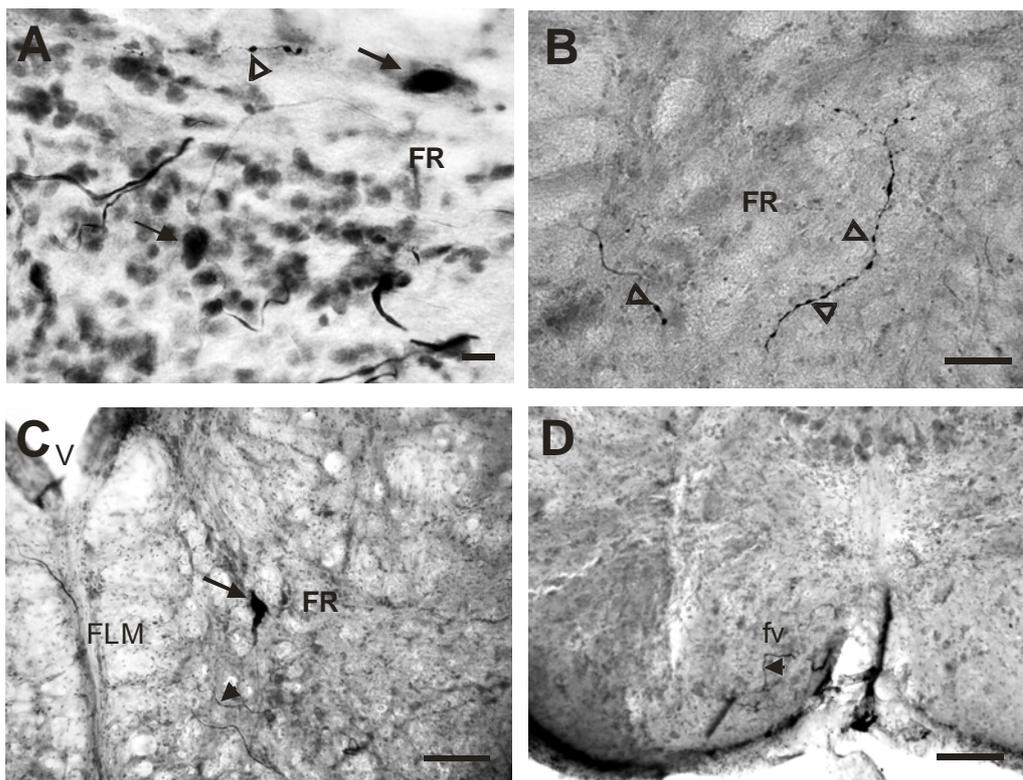


Figura 16. **A)** Neurônios (setas) e varicosidade (ponta de seta aberta) marcados na região da coluna medial da formação reticular (FR) ipsilateral, núcleo médio após o depósito do BDA no TeO. **B)** Varicosidades (pontas de setas abertas) marcadas na região da coluna medial da FR contralateral após o depósito do traçador no TeO. **C)** Neurônio (seta) e fibras (ponta de seta) marcados na coluna medial da FR ipsilateral após o depósito do BDA no TeO. Neste corte é possível observar também fibras marcadas no fascículo longitudinal medial (FLM). **D)** Fibras (ponta de seta) marcadas na região do funículo ventral (fv) ipsilateral da medula espinhal após o depósito do traçador no TeO. Barras = 20 μ m em A, 15 μ m em B, 20 μ m em C e 15 μ m em D.

5 – Discussão

5.1. - Efeitos eletromotores decorrentes da interferência farmacológica em receptores GABAérgicos do TeO de *Gymnotus carapo*.

Nossos dados demonstraram que as microinjeções de bicuculina, antagonista GABAérgico, nas camadas intermediárias e profundas do TeO provocaram alterações na frequência da DOE, assim como respostas esquelomotoras. A maior concentração de bicuculina (1,96 mM) provocou episódios de aumentos abruptos na frequência da descarga, seguidos por uma fase estacionária (“plateau”) muito curta, na qual a frequência pelo menos dobrava seu valor basal. Esta fase de “plateau” era intercalada por episódios breves de aumentos menores na frequência da DOE. Nestes experimentos, as modulações da descarga ocorriam junto com as respostas esquelomotoras, agrupadas em padrões que simulavam o comportamento natural do animal.

As microinjeções de 0,98 mM e 0,49 mM de bicuculina produziram alterações semelhantes da DOE, sem os episódios de aumentos menores na frequência durante a fase de “plateau”. Correlações positivas entre as modulações da descarga e a ocorrência dos padrões esquelomotoros também foram observadas com estas concentrações de bicuculina.

As microinjeções prévias (pré-tratamento) de 15,35 mM de muscimol, agonista GABAérgico, nestas mesmas camadas do TeO foram capazes de bloquear os

aumentos na frequência da DOE e os padrões esquelotomotores observados após as microinjeções de 0,98 mM de bicuculina neste mesmo sítio.

Nossos dados também mostraram que após as microinjeções das diferentes concentrações de bicuculina no TeO além das modulações na frequência da DOE ocorriam alterações na amplitude dos pulsos que compunham a descarga. Porém, nos animais anestesiados e contidos na caixa experimental, os aumentos na frequência da descarga observados após as microinjeções de 0,98 mM de bicuculina não eram acompanhados por modulações na amplitude da DOE e que, portanto, as variações observadas na amplitude dos pulsos nos animais não anestesiados estão relacionadas com a posição relativa do animal com o eletrodo de registro.

A microinjeção de bicuculina 0,245 mM, assim como do agonista muscimol ou salina não alteraram nem a DOE nem o comportamento.

Os aumentos na frequência da descarga induzidos pela maior concentração de bicuculina (1,96 mM) eram mais frequentes e mais duradouros do que aqueles produzidos pelas concentrações de 0,98 mM e 0,49 mM. Também foi possível observar que, com a maior concentração de bicuculina, a latência da resposta do OE (aumentos na frequência) era menor do que aquelas observadas após as microinjeções de 0,98 mM e 0,49 mM. Ocorreu, pois um aumento da magnitude da resposta (aumento da frequência e diminuição da latência) em função do aumento da concentração da droga, sugerindo a especificidade da atuação GABAérgica. Podemos aventar que, devido ao fato da bicuculina ser um antagonista competitivo que se liga aos receptores GABA_A, o aumento da concentração podia competir mais eficientemente para um número fixo de receptores.

Observamos, ademais, que as microinjeções de NMDA (100 mM) nas camadas intermediárias e profundas do TeO provocaram aumentos na frequência da DOE e

respostas esquelomotoras similares àqueles observados após a microinjeção da maior concentração de bicuculina no teto. Os aumentos na frequência da DOE decorrentes da microinjeção de NMDA eram menores e os episódios, mais breves. Aventamos que tais resultados sejam decorrentes da própria cinética dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, cuja ativação depende da ligação simultânea de dois agonistas, o glutamato produzido pelas vesículas sinápticas e, a glicina, do fluido extra-sináptico (ASCHER, 1987; KLECKNER; DINGLEDINE, 1988), assim como de um potencial de membrana despolarizado devido ao bloqueio exercido pelo magnésio extracelular (MACDONALD; WOJTOWICZ, 1982; NOWAK et al., 1984).

Estes episódios de aumentos na frequência da DOE observados após as diferentes concentrações de bicuculina ou NMDA no TeO são bastante parecidos com os aumentos na frequência da descarga observados durante a resposta de novidade (RN), que pode ser considerada uma resposta de orientação a um estímulo novo (CORRÊA; HOFFMANN, 1998; CORRÊA; PEREIRA; HOFFMANN, 1998; POST; VON DER EMDE, 1999; DUARTE et al., 2006A). Em *Gnathonemus petersii*, uma espécie africana de peixe elétrico de campo fraco, a magnitude dos parâmetros da RN como sua duração, amplitude máxima e latência dependem da intensidade do estímulo: se esta é alta, a resposta ocorre mais rapidamente, apresenta maior amplitude e duração longa que estímulos menos intensos (POST; VON DER EMDE, 1999). Nos nossos resultados, este efeito também foi observado: a dose maior de bicuculina produziu latência menor para a ocorrência dos episódios de aumentos na frequência da DOE, os quais eram mais frequentes e duradouros do que aqueles produzidos pelas doses menores de bicuculina.

Como nos nossos resultados foi possível observar que as diferentes concentrações de bicuculina ou 100 mM de NMDA provocavam aumentos na

freqüência da descarga sem modulações da amplitude dos pulsos da DOE, aventamos que tais respostas também podem ser evocadas durante a eletrolocalização ativa destes animais. Este sistema consiste na detecção de objetos por meio da sensibilidade a distorções do campo elétrico gerado pela própria descarga do órgão elétrico do peixe (LISMANN; MACHIN, 1958). Na eletrolocalização ativa, a corrente da descarga do órgão elétrico flui sucessivamente através da pele do animal, passa pela água que o circunda, volta através da sua pele e é percebida pelos eletrorreceptores, localizados em poros que se abrem na superfície do corpo do animal. Tais eletrorreceptores agem como monitores das intensidades locais dos fluxos de correntes elétricas transcutâneas, gerados pela DOE. Objetos com condutividade elétrica diferente da condutividade da água e próximos aos animais podem alterar estes fluxos de correntes e estas mudanças locais representam suas "imagens elétricas" (HEILIGENBERG, 1975;). Objetos puramente resistivos provocam alterações apenas na amplitude do pulso da descarga gerada, já os objetos com componentes capacitivos e resistivos (i.e., impedância complexa), como a maioria dos objetos vivos, provocam alterações tanto na amplitude quanto na forma da DOE gerada (VON DER EMDE; BLECKMANN, 1992).

LISMANN e MACHIN (1958) demonstraram que a amplitude dos pulsos que compõem a DOE local aumenta ou diminui conforme os objetos possuem impedâncias baixas ou altas, respectivamente. Como a impedância do objeto pode ser calculada a partir da fórmula, $Z = R + 1/2\pi fC$, onde Z é a impedância, R é a resistência, f é a freqüência da DOE e C a capacitância, os peixes utilizam modulações na freqüência da DOE a fim de detectar a impedância de um objeto. Dessa maneira, animais, cuja freqüência da DOE é alta, podem detectar impedâncias menores do que aqueles animais que emitem sinais de baixa freqüência (MEYER, 1982). Neste contexto,

modulações na frequência da DOE podem melhorar a identificação e a localização dos objetos encontrados. Não obstante, tais mudanças na frequência da descarga são percebidas pelas estruturas centrais que podem, assim, ajustar o modo como respondem às informações adquiridas. Tais estruturas envolvem o lobo eletrosensorial da linha lateral (ELL), uma estrutura rombencefálica que mantém o mapa somatotópico da superfície corpórea eletorreceptiva e o TSd que recebe as informações do ELL e envia-as para o nE e TeO.

MEYER (1982) também demonstrou que os peixes elétricos de campo fraco da ordem dos Mormyriiformes respondem aos estímulos com componentes capacitivos, resistivos ou com ambos os elementos com aumentos na frequência da DOE (resposta de novidade). Tais respostas apresentam longa duração (>100 ms) e são acompanhadas por aumentos na atividade locomotora.

Estudos anteriores já demonstraram que nos peixes elétricos de campo fraco aumentos na frequência da DOE, os quais ocorrem em resposta à apresentação de estímulos novos, podem ser provocados pela estimulação da subdivisão G do complexo diencefálico CP/PPn cujas projeções liberam glutamato que se liga aos receptores NMDA das células marcapasso do Pn localizado no rombencéfalo (KAWASAKI; HEILIGENBERG, 1988; 1990). Em *Apteronotus leptorhynchus* o substrato neuronal dos aumentos graduais na frequência da DOE envolve a participação do núcleo diencefálico nE, o qual age como uma interface sensório motora entre o sistema eletrosensorial e motor, do núcleo mesencefálico sublemniscal pré-marcapasso (SPPn), que tem um importante papel no controle das modulações da DOE via projeções para o Pn, cujas células relé estão envolvidas em aumentos na frequência da DOE. Normalmente, as células do SPPn estão sob a inibição tônica GABAérgica proveniente da porção dorsal do nE; porém, em determinadas situações

comportamentais, os neurônios desta porção do nE deixam de inibir o SPPn que, por sua vez, envia projeções que liberam glutamato nas células relé do Pn, ativando seus receptores do tipo NMDA, promovendo assim, os aumentos na frequência da DOE (HEILIGENBERG et al., 1996). As características dessas modulações são bastante parecidas com os aumentos na frequência da DOE observados nos nossos experimentos e como o teto não possui conexão direta com o nE, aventamos que a sua conexão com o TSd possa estar envolvida nestas modulações, já que este aferenta o nE (DUARTE et al., 2006).

5.2. – Possíveis substratos neurais envolvidos nos efeitos eletromotores decorrentes da interferência farmacológica em receptores GABAérgicos do TeO de *Gymnotus carapo*.

Sugerimos possíveis substratos neurais que podem estar envolvidos nas modulações da DOE observadas nos nossos experimentos com *Gymnotus carapo*. Um possível substrato envolveria a conexão direta entre o TeO e o CP/PPn. As modulações da DOE decorreriam do bloqueio de receptores GABA_A de interneurônios das camadas intermediárias do TeO, que mantêm uma atuação inibitória tônica sobre os neurônios excitatórios das camadas tectais mais profundas que se projetam para o CP/PPn. A retirada da influência GABAérgica ou a ativação dos receptores NMDA desses neurônios tectais levaria à excitação dos neurônios da porção lateral do complexo CP/PPn. Sugerimos que a ativação desta porção do complexo causa a ativação dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA das células marcapasso provocando um aumento na frequência da descarga (Fig.17A), como acontece em *Hypopomus* e *Eigenmannia* (KENNEDY; HEILIGENBERG, 1994; KAWASAKI; HEILIGENBERG, 1990).

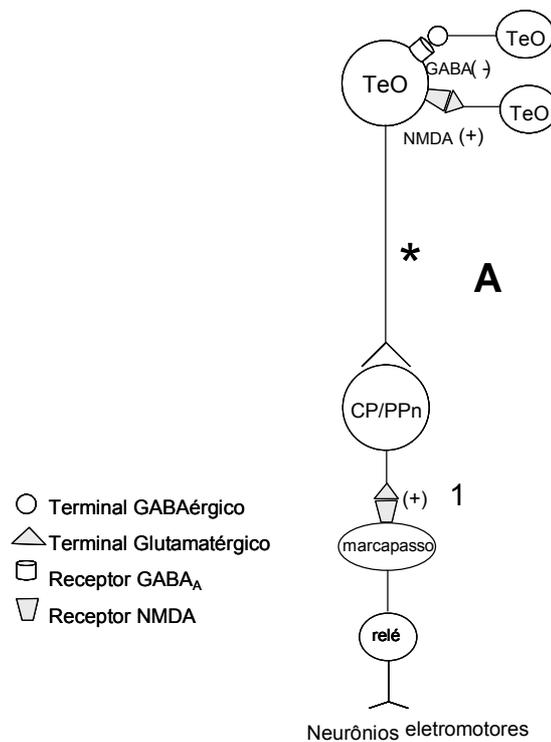


Figura 17A. Diagrama do proposto substrato neural e neuroquímico envolvido nas respostas eletromotoras observadas após as microinjeções das diferentes concentrações de bicuculina (0,49 mM; 0,98 mM e 1,96 mM) ou NMDA (100 mM) no TeO de *Gymnotus carapo*. Este modelo é baseado nos achados funcionais e neuroanatômicos deste trabalho (*) e de outros autores (1 – KENNEDY; HEILIGENBERG, 1994).

Outro substrato envolveria a conexão bidirecional entre o TeO e o TSd. Em *Eigenmannia*, neurônios multipolares do TeO, mais precisamente da camada SAC, enviam projeções para os neurônios da camada VIII do TSd que estão envolvidos nas modulações da DOE (ROSE; HEILIGENBERG, 1985). Aventamos a hipótese de que a

retirada gradual ou brusca da influência GABAérgica ou a ativação dos receptores NMDA dos neurônios tectais excitatórios das camadas profundas do TeO levaria à excitação dos neurônios da camada VIII do TSd. Em *Gymnotus carapo*, a conexão direta entre os neurônios desta camada do TSd e o nE já foi demonstrada em trabalho anterior de nosso grupo (DUARTE et al.; 2006) e aventamos a possibilidade de que do nE as informações seguem a mesma rota descrita para os aumentos graduais da frequência (Fig. 17B) descrito em *Apteronotus leptorhynchus* (HEILIGENBERG et al., 1996).

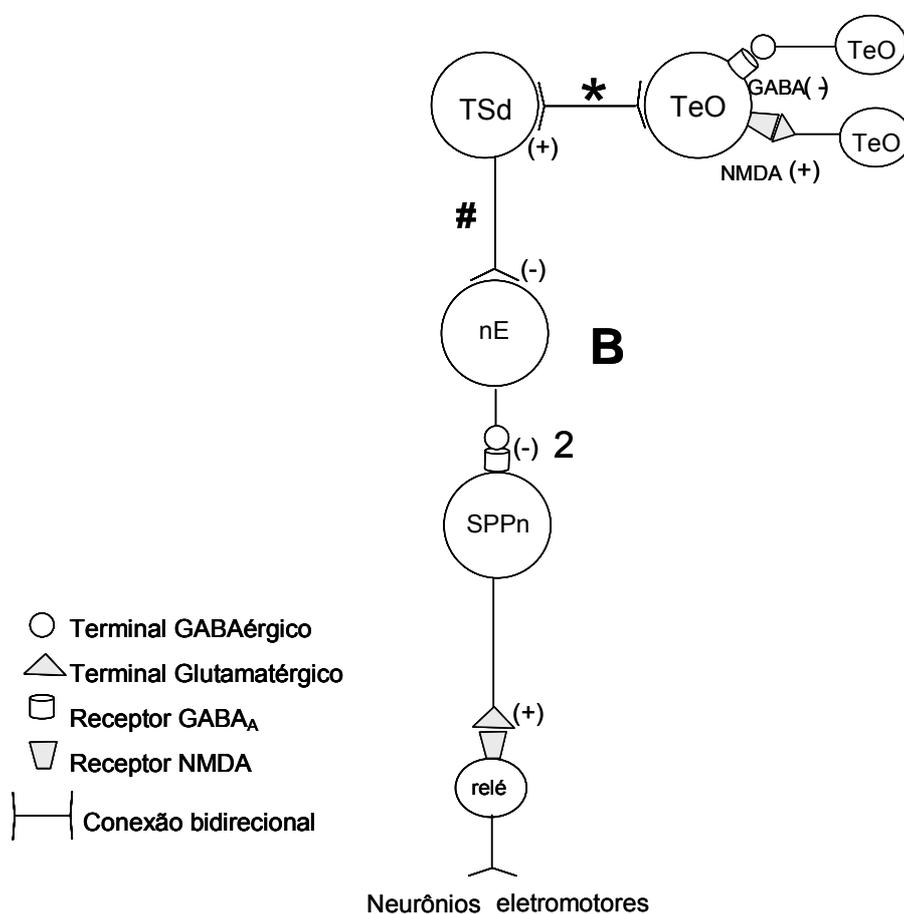


Figura 17B. Diagrama do proposto substrato neural e neuroquímico envolvido nas respostas eletromotoras observadas após as microinjeções das diferentes concentrações de bicuculina (0,49 mM; 0,98 mM e 1,96 mM) ou NMDA (100 mM) no TeO de *Gymnotus carapo*. Este modelo é baseado nos achados funcionais e

neuroanatômicos deste trabalho (*), resultados anteriores deste laboratório (#) e de outros autores (2 –HEILIGENBERG et al., 1996).

Nossos achados neuroanatômicos corroboram os fisiológicos, fornecendo evidências para os substratos propostos. Após deposição do BDA nas camadas intermediárias e profundas do TeO, as quais abrangem a SAC, SGC e SFGC, fibras varicosas foram marcadas na porção lateral do complexo CP/PPn e na camada VIII do TSd.

5.3. – Possíveis substratos neurais envolvidos na modulação dos processos atencionais de *Gymnotus carapo*.

Nossos resultados anatômicos também mostraram que o TeO recebe aferências da região dorsocentral do telencéfalo dorsal (Dc) que, além de centro de convergência de outras regiões paliais, é a principal fonte de aferências telencefálicas para regiões mais caudais do SNC (CORRÊA; GRANT; HOFFMANN, 1998). Estudos anteriores realizados em nosso laboratório já demonstraram que estímulos luminosos provocavam aumentos na frequência da DOE de *Gymnotus carapo* e que após lesões em Dc, estes animais não apresentavam essa resposta (SANTANA, 2002).

As conexões entre Dc e o TeO observadas nos nossos resultados podem estar envolvidas na modulação, mas não na geração, dos processos atencionais desencadeados por estímulos novos. Sugerimos que os episódios de aumentos na frequência da DOE apresentados após a maior concentração de bicuculina (1,96 mM) ou NMDA (100 mM) no TeO podem estar envolvidos com a atenção. Sugerimos que quando este sistema de controle da atenção torna-se ativo, uma rede complexa é acionada, envolvendo a participação de áreas telencefálicas, como acontece nos mamíferos. Nestes, estímulos novos ou inesperados recrutam sistemas corticais

glutamatérgicos envolvidos com a atenção, e essa ativação pode acontecer tanto por interferência dos sistemas serotoninérgico, dopaminérgico, quanto do colinérgico (FADEL et al., 1998; SARTER; BRUNO, 2000).

Nos mamíferos, o CS também está associado à atenção espacial já que é responsável pelo controle da iniciação dos movimentos sacádicos dos olhos em direção a um objeto que atraiu a atenção do animal (WURTZ; ALBANO, 1980; DEAN et al., 1989), assim como pela fixação dos olhos num ponto que permite que a imagem do mesmo incida sobre a parte da retina com maior acuidade. Geralmente, os movimentos sacádicos dos olhos acompanham deslocamentos da atenção, de modo que os alvos localizados na fóvea recebam processamento máximo. Em gatos e macacos, déficits na atenção foram observados após lesões das camadas intermediárias e profundas do CS (HARDY; STEIN, 1988; BERSON; MCILWAIN, 1983). Estudos realizados em macacos despertos, enquanto estes examinavam uma tela, demonstraram que as células do colículo superior aumentavam sua taxa de disparos quando o animal era ensinado a prestar atenção em local - alvo (KURTZ; BUTTER, 1980; MACKWORTH; BAGSHAW, PRIBRAM, 1970; MESULAM et al., 1977). BERGER; POSNER (2000) também demonstraram déficits no deslocamento da atenção aos alvos sugeridos nos pacientes portadores de doenças degenerativas que afetam as estruturas mesencefálicas, principalmente o colículo superior. Nos pacientes com lesões envolvendo o CS, uma prolongada latência nos movimentos sacádicos dos olhos era observada devido a um defeito no desacoplamento da atenção visual do objeto de interesse (PIERROT-DESEILLIGNY et al., 1991). Embora os estudos anteriores indiquem a participação do CS no deslocamento da atenção utilizado nos movimentos sacádicos dos olhos, o CS também participa nos

processos atencionais na ausência dos movimentos dos olhos (ROBINSON; KERTZMAN; 1995).

Em ratos estudos já demonstraram que sinais visuais relevantes ativam a projeção tectonigral produzindo a excitação dos neurônios dopaminérgicos da SNr e que esta ativação está relacionada com processos pré-atencionais (COMOLI et al., 2003). A atividade destes neurônios dopaminérgicos representa um componente essencial nos processos de atenção e seleção dos comportamentos apropriados aos estímulos inesperados e importantes e esta resposta é um pré-requisito crucial para a aprendizagem associativa e parte de uma resposta geral de latência bastante curta que prepara o organismo para uma reação apropriada ao evento biologicamente significativo (REDGRAVE; PRESCOTT; GURNEY, 1999).

Nos peixes elétricos, a atenção pode ser associada aos aumentos prolongados na frequência da DOE observados quando estes animais estão ativos, perturbados ou de outro modo excitados (BRAUN, comunicação pessoal). Como cada DOE proporciona informações sobre o ambiente (eletrolocalização ativa), um aumento na frequência da descarga reflete um aumento no fluxo de informações sensoriais para o peixe que pode assim, processar qual estímulo será analisado em detalhes e qual será levado em consideração para guiar seus comportamentos. Em *Steatogenys sp.* aumentos prolongados da DOE podem ser observados durante a noite, quando esses animais estão explorando o meio e são mais frequentes durante a exploração de ambientes novos. Nessa ocasião, a frequência da DOE eleva-se instantaneamente e se mantém alta durante todo o período ativo do animal (BRAUN et al., 2007).

Hipotetizamos que nos peixes, as informações processadas pelas camadas tectais profundas sejam enviadas para o TSd que, por sua vez, conecta-se com o nE. Sugerimos que a ativação do nE produza a ativação do núcleo préglomerular,

conectado reciprocamente com Dc (DUARTE et al., dados não publicados) que por sua vez envia projeções para o TeO. A partir desta estrutura as informações podem seguir as rotas já descritas para os aumentos na frequência da DOE (Fig. 17C).

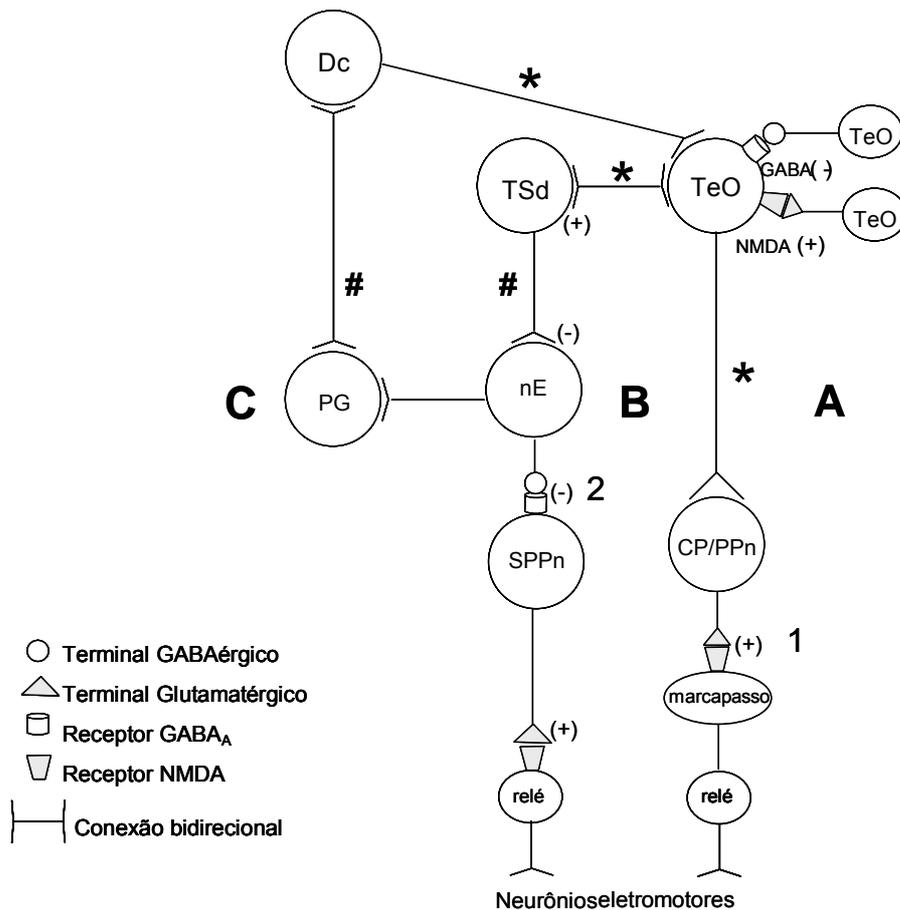


Figura 17C. Diagrama dos propostos substratos neurais e neuroquímicos envolvidos nas respostas eletromotoras observadas após as microinjeções das diferentes concentrações de bicuculina (0,49 mM; 0,98 mM e 1,96 mM) ou NMDA (100 mM) no TeO de *Gymnotus carapo*. Este modelo é baseado nos achados funcionais e neuroanatômicos deste trabalho (*), resultados anteriores deste laboratório (#) e de outros autores (1 – KENNEDY; HEILIGENBERG, 1994; 2 – HEILIGENBERG et al., 1996).

5.4. – Efeitos esqueléticos decorrentes da interferência farmacológica em receptores GABAérgicos do TeO de *Gymnotus carapo*.

As microinjeções de bicuculina no TeO de *Gymnotus carapo* além das modulações da DOE, induziram respostas motoras cujos componentes podem ser descritos como integrantes do comportamento de orientação que ocorre durante a eletrolocalização ativa, principalmente durante a exploração de ambientes e objetos novos. Como o órgão elétrico está localizado ao longo do tronco e da cauda destes animais,, qualquer movimento desta parte do corpo provoca alterações nas características das imagens elétricas causadas pelos objetos próximos ao peixe. Nos nossos resultados observamos que os animais nadavam com a cabeça um pouco inclinada para baixo, fazendo com que a região onde se situa a maioria dos eletrorreceptores rostrais ficasse apontada para cima e realizavam movimentos rápidos com a cabeça de um lado para o outro. Estudos anteriores já demonstraram que em *Gymnotus carapo* existem duas regiões denominadas de fóvea e parafóvea, localizadas logo abaixo e acima do nariz, que são ricas em eletrorreceptores cujas informações são enviadas para uma larga área do ELL, uma região responsável pelo primeiro processamento das informações eletrosensoriais assim como para o TSd, para onde o ELL se projeta. Em *Gnathonemus petersii* experimentos comportamentais demonstraram que estas duas regiões possuem funções importantes durante a eletrolocalização ativa dos objetos novos e quando estes animais aproximam-se de tais objetos, os eletrorreceptores da região nasal são os primeiros a serem influenciados (VON DER EMDE; SCHWARZ, 2002).

Também, as alterações na postura e os movimentos de natação para trás, observadas após as microinjeções, podem ser considerados estratégias comportamentais de orientação: como existe uma parcela de eletrorreceptores

localizada na região dorsal do animal, tais alterações da postura podem reposicionar o corpo e assim facilitar a localização de objetos desconhecidos (HEILIGENBERG, 1973; LANNOO; LANNOO, 1993; HOPKINS et al., 1997; NANJAPPA; BRAND; LANNOO, 2000).

O aparecimento de terminais na FR, no núcleo RMT e na medula espinal, após o depósito de BDA no TeO (camadas SGC e SAC), indica que várias vias podem estar envolvidas no controle das respostas motoras observadas após as microinjeções das diferentes concentrações de bicuculina ou 100 mM de NMDA no TeO. A partir do TeO, as respostas motoras podem alcançar a medula espinal diretamente pela via tetoespinal ou indiretamente pelas vias tetorreticular e tetotegmental. Em *Eigenmannia*, conexões recíprocas entre o TeO e a FR já foram identificadas e estas conexões acontecem com neurônios situados na coluna média da FR, de onde partem as vias descendentes para a medula espinal. Também em *Eigenmannia* a estimulação elétrica dessa coluna induz diferentes tipos de respostas esquelomotoras, tais como movimentos da musculatura do tronco e da nadadeira, ocasionando os movimentos de natação para frente ou para trás (BEHREND; DONICHT, 1990).

Nos mamíferos, as funções das projeções tectais descendentes já foram extensivamente investigadas (ELLARD; GOODALE, 1986; SPARKS; JAY, 1986; DEAN et al., 1988; KEAY et al., 1990). As vias descendentes ipsi e contralaterais estão envolvidas em várias funções visuomotoras, estando as primeiras envolvidas com os movimentos de esquiva aos obstáculos e objetos aversivos, e as contralaterais com os movimentos de aproximação e orientação em direção aos objetos novos ou desejados (DEAN et al., 1986; 1988; KEAY et al., 1990). Essas funções são mediadas via as conexões com os centros pré-motores do mesencéfalo e rombencéfalo (KUYPERS; MAISKY, 1975), assim como diretamente com a medula espinal. Assim, essas vias

descendentes representam distintos canais de saída, que estão sujeitas a diversas influências de diferentes áreas do sistema nervoso central e medeiam respostas distintas a um estímulo novo.

Observamos também neurônios retrogradamente marcados nos núcleos RMT, e FR. Resultados similares foram vistos em *Carassius* (PÉREZ-PÉREZ et al. 2003) e foi proposto que esses neurônios participariam de circuitos de retroalimentação tetorreticulares. Esses circuitos poderiam estar envolvidos no cálculo das diferenças entre as amplitudes desejadas e aquelas realmente executadas dos movimentos sacádicos e codificar um sinal motor que guiasse os movimentos dos olhos para seu alvo e estes sinais de retroalimentação que chegam ao teto poderiam exercer, pelo menos em parte, uma influência inibitória (APPELL; BEHAN 1990; CORVISIER; HARDY 1991). Também nos peixes elétricos, essas projeções reticulotectais poderiam funcionar como um sistema capaz de ajustar os padrões motores executados pelo TeO, assim como sugere a participação da FR na modulação dos comandos tectais já que está última recebe informações sensoriais provenientes da medula (EWERT et al. 1990).

9 - Conclusões

- As microinjeções de bicuculina ou NMDA nas camadas intermediárias e profundas do TeO de *Gymnotus carapo* provocaram episódios de aumentos abruptos na frequência da descarga e respostas esqueléticas.
- Estes episódios de aumentos na frequência da descarga do órgão elétrico são bastante parecidos com os aumentos na frequência da descarga observados durante a resposta de novidade, que pode ser considerada uma resposta de orientação a um estímulo novo.
- Como os aumentos na frequência da descarga observados após as microinjeções de bicuculina nas camadas intermediárias e profundas do TeO não são acompanhados por modulações da amplitude dos pulsos da descarga, sugerimos que tais respostas também podem ser evocadas durante a eletrolocalização ativa destes animais.
- A conexão direta entre o TeO e o CP/PPn, ou a conexão bidirecional entre o TeO e o TSd podem estar envolvidas nas modulações da DOE observadas nos nossos experimentos com *Gymnotus carapo*.
- Os episódios de aumentos na frequência da DOE apresentados após a maior concentração de bicuculina (1,96 mM) ou NMDA no TeO podem ser associados com a atenção, e a conexão entre Dc e o TeO pode estar envolvida na modulação dos processos atencionais desencadeados por estímulos novos.
- A partir do TeO as respostas esqueléticas apresentadas após as microinjeções de bicuculina ou NMDA podem alcançar a medula espinal diretamente pela via tetoespinal ou indiretamente pelas vias tetorreticular e tetotegmental.

- Substanciados nos resultados funcionais e anatômicos deste trabalho, propomos que o TeO de *Gymnotus carapo* participe da produção de mecanismos neuronais responsáveis pela produção e/ou modulação dos padrões eletromotores e esqueletomotores ligados ao comportamento de orientação e atenção.

10 - Referências Bibliográficas

- Al-Akel AS, Guthrie DM, Banks JR. Motor responses to localized electrical stimulation of the tectum in the freshwater perch (*Perca fluviatilis*). *Neurosci.* 1986; 19:1381-91.
- Appell PP, Behan M. Sources of subcortical GABAergic projections to the superior colliculus in the cat. *J. Comp. Neurol.* 1990; 302:143-158.
- Bagshaw MH; Mackworth NH; Pribram KH. The effect of inferotemporal cortex ablations on eye movements of monkeys during discrimination training. *Int. J. Neurosci.* 1970;1: 153-158.
- Bastian J. Visual and electrosensory responses in the optic tectum of a weakly electric fish. 11th Annual Meeting, Society for Neuroscience, Los Angeles, California, 1981; Abstr. No 272-9
- Bastian J. Vision and electroreception: integration of sensory information in the optic tectum of the weakly electric fish *Apteronotus albifrons*. *J. Comp. Physiol. A.* 1982; 147: 287-297.
- Behrend K, Donicht M. Descending connections from the brainstem to the spinal cord in the electric fish *Eigenmannia*. Quantitative description based on retrograde horseradish peroxidase and fluorescent-dye transport. *Brain Behav. Evol.* 1990; 35: 227-239.
- Berger A, Posner MI. Pathologies of brain attentional networks. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2000; 24: 3-5.
- Berson DM; McIlwain JT. Visual cortical inputs to deep layers of cat's superior colliculus. *J. Neurophysiol.* 1983; 50: 1143-1155.
- Blanchard RJ; Blanchard DC. Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. *J. Comp. Psychol.* 1989; 103: 70-82.
- Brandão ML; Anseloni VZ; Pandóssio JE; De Araújo JE; Castilho VM. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1999; 23: 863-875.
- Braun C; Berry RJ; Schmitt R; Alves-Gomes JA. The phylogenetic history of electric organ discharge rate modulations in pulse-discharging gymnotiform fishes. In: VIII International Society for Neuroethology. 2007.
- Butler AB. Variation of tectal morphology in teleost fishes. *Brain. Behav. Evol.* 1992; 40: 256-272.
- Carr CE; Maler L; Heiligenberg W; Sas E. Laminar organization of the afferent and efferent systems of the torus semicircularis of gymnotiform fish: morphological

substrates for parallel processing in the electrosensory system. *J. Comp. Neurol.* 1982; 203: 649-670.

Comoli, E; Canteras NS. Comportamento predatório: um estudo da ativação neural em ratos durante o ato de caçar baratas. XV Encontro Anual de Etologia, São Carlos, SP, 1997. PP. 361-361.

Comoli, E; Canteras NS. Lateralmost region of intermediate layer of superior colliculus: a key site involved in the motor control of predatory hunting. XXX Annual Meeting, Society for Neurosciences, New Orleans, LO, 2000. v. 26. pp. 2257-2257.

Comoli E; Coizet V; Boyes J; Bolam JP; Canteras NS; Quirk RH; Overton PG; Redgrave P. A direct projection from superior colliculus to substantia nigra for detecting salient visual events. *Nat. Neurosci.* 2003; 6: 974-980.

Corrêa SAL; Pereira ASF; Hoffman A. Effect of drugs that alter alertness and emotionality on the novelty response of a weak electric fish, *Gymnotus carapo*. *Physiol Behav.* 1999; 65: 863-869.

Corrêa SA; Grant K; Hoffmann A. Afferent and efferent connections of the dorsocentral telencephalon in an electrosensory teleost, *Gymnotus carapo*. *Brain Behav. Evol.* 1998; 52: 81-98.

Corvisier J, Hardy O. Possible excitatory and inhibitory feedback to the superior colliculus: a combined retrograde and immunocytochemical study in the prepositus hypoglossi nucleus of the guinea pig. *Neurosci. Res.* 1991;12: 486-502.

Cowie RJ; Robinson DL. Subcortical contributions to head movements in macaques. I. Contrasting effects of electrical stimulation of a medial pontomedullary region and the superior colliculus. *J. Neurophysiol.* 1994; 72: 2648-2664.

Dean P; Redgrave P. The superior colliculus and visual neglect in rat and hamster. II. Possible mechanisms. *Brain Res.* 1984a; 320: 143-153.

Dean P; Redgrave P. The superior colliculus and visual neglect in rat and hamster. I. Behavioural evidence. *Brain Res.* 1984b; 320: 129-141.

Dean P, Redgrave P, Sahibzada N, Tsuji K. Head and body movements produced by electrical stimulation of superior colliculus in rats: effects of interruption of crossed tectoreticulospinal pathway. *Neurosci.* 1986; 19: 367-380.

Dean P, Mitchell IJ; Redgrave P. Contralateral head movements produced by microinjections of glutamate into superior colliculus of rats, evidence for mediation by multiple output pathways. *Neurosci.* 1988a; 24: 491-500.

Dean P, Mitchell IJ, Redgrave P. Responses resembling defensive behavior produced by microinjection of glutamate into superior colliculus of rats. *Neurosci.* 1988b; 24: 501-10.

Dean P, Redgrave P, Westby GWM. Event or emergency? Two response systems in the mammalian superior colliculus. *Trends Neurosci.* 1989; 12: 137-147.

Dicke U; Roth G. Tectal activation of premotor and motor networks during feeding in salamanders. *Eur. J. Morphol.* 1994; 32: 106-116.

Distel H. Behavior and electrical brain stimulation in the green iguana, *Iguana iguana* L. II. Stimulation effects. *Exp. Brain Res.* 1978; 31: 353-367.

Drager UC; Hubel DH. Topography of visual and somatosensory projections to mouse superior colliculus. *J. Neurophysiol.* 1976; 39: 91-102.

Duarte TT, Corrêa SAL, Pereira ASF, Hoffmann A. Potential output pathways for agonistic-like responses from the torus semicircularis dorsalis in the weakly electric fish, *Gymnotus carapo*. *Brain Res.* 2006; 1092:117-128.

Dye J, Heiligenberg W, Keller CH, Kawasaki M. Different classes of glutamate receptors mediate distinct behaviors in a single brainstem nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1989; 86: 8993-8997.

Edwards SB; Ginsburgh CL; Henkel CK; Stein BE. Sources of subcortical projections to the superior colliculus in the cat. *J. Comp. Neurol.* 1979; 184:309-329.

Eichenberger GC; Ribeiro SJ; Osaki MY; Maruoka RY; Resende GC; Castellán-Baldan L; Corrêa SA; Da Silva LA; Coimbra NC. Neuroanatomical and psychopharmacological evidence for interaction between opioid and GABAergic neural pathways in the modulation of fear and defense elicited by electrical and chemical stimulation of the deep layers of the superior colliculus and dorsal periaqueductal gray matter. *Neuropharmacology.* 2002; 421: 48-59.

Ellard CG, Goodale MA. The role of the predorsal bundle in head and body movements elicited by electrical stimulation of the superior colliculus in the Mongolian gerbil. *Exp. Brain Res.* 1986; 64: 421-433.

Ewert JP; Framing EM; Schürg-Pfeiffer E; Weerasuriya A. Responses of medullary neurons to moving visual stimuli in the common toad. I. Characterization of medial reticular neurons by extracellular recording. *J. Comp. Physiol. A.* 1990; 167: 495-508.

Freedman EG; Sparks DL. Activity of cells in the deeper layers of the superior colliculus of the rhesus monkey: evidence for a gaze displacement command. *J. Neurophysiol.* 1997; 78: 1669-1690.

Gathan E; Tanger P; Baier H. Visual prey capture in larval zebrafish is controlled by identified reticulospinal neurons downstream of the tectum. *J. Neurosci.* 2005; 25: 9294-9303.

Grantyn A; Berthoz A. Burst activity of identified tecto-reticulo-spinal neurons in the alert cat. *Exp. Brain Res.* 1985; 57: 417-421.

Hardy SC; Stein BE. Small lateral suprasylvian cortex lesions produce visual neglect and decreased visual activity in the superior colliculus. *J. Comp. Neurol.* 1988; 273: 527-542.

Hartline P. Thermoreception in snakes. Em: Fessard A (ed) *Handbook of sensory physiology*, vol III/3. Springer, Berlin Heidelberg New York. 1974; pp 297-312.

Harvey AR, Worthington DR. The projection from different visual cortical areas to the rat superior colliculus. *J. Comp. Neurol.* 1990 ;298: 281-292.

Herrero L; Rodríguez F; Salas C; Torres B. Tail and eye movements evoked by electrical microstimulation of the optic tectum in goldfish. *Exp. Brain Res.* 1998; 120: 291-305.

Heiligenberg W. Electrolocation of objects in the electric fish *Eigenmannia* (Rhamphichthyidae). *J. Comp. Physiol.* 1973; 87: 137-164.

Heiligenberg W, Rose G. The optic tectum of the gymnotiform electric fish, *Eigenmannia*: labeling of the physiologically identified cells. *Neurosci.* 1987; 22: 331-340.

Heiligenberg W; Metzner W; Wong CJ; Keller CH. Motor control of the jamming avoidance response of *Apteronotus leptorhynchus*: evolutionary changes of a behavior and its neuronal substrates. *J. Comp. Physiol. A.* 1996; 179: 653-674.

Hikosaka O; Wurtz RH. Modification of saccadic eye movements by GABA-related substances. I. Effect of muscimol and bicuculline in monkey superior colliculus. *J. Neurophysiol.* 1985; 53: 266-291.

Hopkins CD; Shieh KT; McBride DW Jr; Winslow M. A quantitative analysis of passive electrolocation behavior in electric fish. *Brain Behav. Evol.* 1997; 1: 32-59.
Kandel; Schwartz; Jessel.

Ingle D; Sprague JM. Sensorimotor function of the midbrain tectum. Em: *Neuroscience research program bulletin*, vol. 13. MIT Press, Cambridge, Massachusetts. 1977.

Ito H; Butler AB; Ebbesson SO. An ultrastructural study of the normal synaptic organization of the optic tectum and the degenerating tectal afferents from retina, telencephalon, and contralateral tectum in a teleost, *Holocentrus rufus*. *J. Comp. Neurol.* 1980; 191: 639-659.

Kawasaki M, Heiligenberg W. Individual pacemaker neurons can modulate the pacemaker cycle of the gymnotiform electric fish, *Eigenmannia*. *J. Comp. Physiol. A* 1988; 162: 13-21.

Kawasaki M, Heiligenberg W. Different classes of glutamate receptors and GABA mediate distinct modulations of a neuronal oscillator, the medullary pacemaker of a gymnotiform electric fish. *J. Neurosci.* 1990; 10: 3896-3904.

Keay K; Westby GW; Frankland P; Dean P; Redgrave P. Organization of the crossed tecto-reticulo-spinal projection in rat--II. Electrophysiological evidence for separate output channels to the periauducens area and caudal medulla. *Neurosci.* 1990; 37: 585-601.

Kennedy G, Heiligenberg W. Ultrastructural evidence of GABA-ergic inhibition and glutamatergic excitation in the pacemaker nucleus of the gymnotiform electric fish, *Hypopomus*. *J. Comp. Physiol. A* 1994; 174: 267-280.

King SM; Dean P. Redgrave P. Bypassing the saccadic pulse generator: possible control of head movement trajectory by rat superior colliculus. *Eur. J. Neurosc.* 1991; 3: 790-801.

Kleckner NW, Dingledine R. Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science* 1988; 241: 835-837.

Kurtz D; Butter CM. Impairments in visual discrimination performance and gaze shifts in monkeys with superior colliculus lesions. *Brain Res.* 1980; 196:109-124.

Kuypers HG, Maisky VA. Funicular trajectories of descending brain stem pathways in cat. *Brain Res.* 1977; 136: 159-165.

Laming PR; Borchers HW; Ewert JP. Visual unit, EEG and sustained potential shift responses in the brains of toads (*Bufo bufo*) during alert and defensive behavior. *Physiol. Behav.* 1984; 32: 463-468.

Laming PR; Ocherashvili IV; Nicol AU; Roughan JV; Laming BA. Sustained potential shifts in the toad tectum reflect prey-catching and avoidance behavior. *Behav. Neurosci.* 1995; 109: 150-160.

Lannoo MJ; Lannoo SJ. Why do electric fishes swim backwards? An hypothesis based on gymnotiform foraging behavior interpreted through sensory constraints. *Env. Biol. Fish* 1993; 36: 157-165.

Lissmann HW. On the function and evolution of electric organs in fish. *J. Exp. Biol.* 1958; 35: 156-191.

Lissmann HW; Machin KE. The mechanism of object location in *Gymnarchus niloticus* and similar fish. *J. Exp. Biol.* 1958; 35: 451-486.

Luque MA; Perez-Perez MP; Herrero L; Torres B. Involvement of the optic tectum and mesencephalic reticular formation in the generation of saccadic eye movements in goldfish. *Brain Res. Rev.* 2005; 49: 388-397.

Luque MA; Perez-Perez MP; Herrero L; Torres B. Connections of eye-saccade-related areas within mesencephalic reticular formation with the optic tectum in goldfish. *J. Comp. Neurol.* 2007; 500:6-19.

Macdonald JF, Wojtowicz JM. The effects of L-glutamate and its analogues upon the membrane conductance of central murine neurons in culture. *J. Physiol. Pharmacol.* 1982; 60: 282-296.

Maler L, Sas E, Ellis JW. An atlas of the brain of the electric fish *Apteronotus leptorhynchus*. *J. Chem. Neuroanatomy* 1991; 4: 1-38.

Mcconville J; Sterritt L; Laming PR. Behavioural responses to electrical and visual stimulation of the toad tectum. *Behav. Brain Res.* 2006; 170:15-22.

Meek J. Functional anatomy of the tectum mesencephali of the goldfish. An explorative analysis of the functional implications of the laminar structural organization of the tectum. *Brain Res. Rev.* 1983; 6: 247-297.

Meredith MA; Miller LK; Ramoa AS; Clemo HR; Behan M. Organization of the neurons of origin of the descending pathways from the ferret superior colliculus. *Neurosci. Res.* 2001; 40: 301-313.

Metzner W. The jamming avoidance response in *Eigenmannia* is controlled by two separate motor pathways. *J. Neurosci.* 1993; 13: 1862-1878.

Meyer JH. Behavioral responses of weakly electric fish to complex impedances. *J. Comp. Physiol.* 1982; 145: 459-470.

Moschovakis AK; Dalezios Y; Petit J; Grantyn AA. New mechanism that accounts for position sensitivity of saccades evoked in response to stimulation of superior colliculus. *J. Neurophysiol.* 1998; 80: 3373-3379.

Moschovakis AK, Karabelas AB, Highstein SM. Structure-function relationships in the primate superior colliculus. I. Morphological classification of efferent neurons. *J. Neurophysiol.* 1988; 60: 232-262.

Nanjappa P; Brand L; Lannoo MJ. Swimming patterns associated with foraging in phylogenetically and ecologically diverse American weakly electric teleosts (Gymnotiformes). *Env. Biol. Fish* 2000; 58: 97-104.

Newman EA; Hartline P. Integration of visual and infrared information in bimodal neurons of the rattlesnake optic tectum. *Science.* 1981; 213: 789-791.

Northmore DP; Levine ES; Schneider GE. Behavior evoked by electrical stimulation of the hamster superior colliculus. *Exp. Brain Res.* 1988; 73: 595-605.

Nowak L, Bregetowski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurons. *Nature* 1984; 307: 462-465.

Olivier E, Kitama T, Grantyn A. Anatomical evidence for ipsilateral collicular projections to the spinal cord in the cat. *Exp. Brain Res.* 1994; 100: 160-164.

Overton P, Dean P, Redgrave P. Detection of visual stimuli in far periphery by rats: possible role of superior colliculus. *Exp. Brain Res.* 1985; 59: 559-569.

Paré M; Guitton G. The fixation area of the cat superior colliculus: effects of electrical stimulation and direct connection with brainstem omnipause neurons. *Exp. Brain Res.* 1994; 101: 109-122.

Pérez-Pérez MP; Luque MA; Herrero L; Nunez-Abades PA; Torres B. Connectivity of the goldfish optic tectum with the mesencephalic and rhombencephalic reticular formation. *Exp. Brain Res.* 2003; 151:123-135.

Pierrot-Deseilligny C; Rosa A; Masmoudi K; Rivaud S; Gaymard B. Saccade deficits after a unilateral lesion affecting the superior colliculus. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 1991; 54:1106-1109.

Post N; von der Emde G. The "novelty response" in an electric fish: response properties and habituation. *Physiol Behav.* 1999; 68:115-128.

Robinson DL; Kertzman C. Covert orienting of attention in macaques. III. Contributions of the superior colliculus. *J. Neurophysiol.* 1995; 74:713-721.

Rose G, Heiligenberg W. Structure and function of electrosensory neurons in the torus semicircularis of *Eigenmannia*: morphological correlates of phase and amplitude sensitivity. *J. Neurosci.* 1985; 5 :2269-2280.

Rowland B; Stanford T; Stein B. A Bayesian model unifies multisensory spatial localization with the physiological properties of the superior colliculus. *Exp. Brain Res.* 2007; 180: 153-161.

Sahibzada N; Dean P; Redgrave P. Movements resembling orientation or avoidance elicited by electrical stimulation of the superior colliculus in rats. *J. Neurosci.* 1986; 6: 723-733.

Saito Y; Isa T. Local excitatory network and NMDA receptor activation generate a synchronous and bursting command from the superior colliculus. *J. Neurosci.* 2003; 23: 5854-5864.

Santana UJ. Interação do sistema gabaérgico do telencéfalo dorsal na modulação da frequência de descarga do órgão elétrico no peixe *Gymnotus carapo*. Tese de doutoramento apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e letras de Ribeirão Preto. 2002

Sarter M; Bruno JP. Cortical cholinergic inputs mediating arousal, attentional processing and dreaming: differential afferent regulation of the basal forebrain by telencephalic and brainstem afferents. *Neurosci.* 2000; 95: 933-952.

Sas E; Maler L. The optic tectum of gymnotiform teleosts *Eigenmannia virescens* and *Apteronotus leptorhynchus*: a Golgi study. *Neurosci.* 1986; 18: 215-246.

Shammah-Lagnado SJ; Costa MS; Ricardo JA. Afferent connections of the parvocellular reticular formation: a horseradish peroxidase study in the rat. *Neurosci.* 1992; 50: 403-425.

Schenberg LC; Póvoa RM, Costa AL, Caldellas AV, Tufik S, Bittencourt AS. Functional specializations within the tectum defense systems of the rat. *Neurosci Biobehav Rev.* 2005; 298:1279-1298.

Sparks DL. Translation of sensory signals into commands for control of saccadic eye movements: role of primate superior colliculus. *Physiol. Rev.* 1986; 66:118-171.

Sparks DL, Jay MF. The functional organization of the primate superior colliculus: a motor perspective. *Prog. Brain Res.* 1986; 64: 235-241.

Torres B; Pérez-Pérez MP; Herrero L; Ligeró M; Nunez-Abades PA. Neural substrata underlying tectal eye movement codification in goldfish. *Brain res. Bull.* 2002; 57: 345-348.

Torres B; Luque MA; Pérez-Pérez MP; Herrero L. Visual orienting response in goldfish: a multidisciplinary study. *Brain Res. Bull.* 2005; 66: 376-380.

Vanegas H; Laufer M; Amat J. The optic tectum of a perciform teleost. I. General configuration and cytoarchitecture. *J. Comp. Neurol.* 1974; 154: 43-60.

Von der Emde G; Bleckmann H. Differential responses of two types of electroreceptive afferents to signal distortions may permit capacitance measurement in a weakly electric fish, *Gnathonemus petersii*. *J. Comp. Physiol. A* 1992; 171: 683-694.

Von der Emde G; Schwarz S. Imaging of objects through active electrolocation in *Gnathonemus petersii*. *J. Physiol. Paris.* 2002; 96: 431-444.

Yager D; Sharma SC; Grover BG. Visual function in goldfish with unilateral and bilateral tectal ablation. *Brain Res.* 1977; 137: 267-275.

Werner W; Hoffmann KP; Dannenberg S. Anatomical distribution of arm-movement-related neurons in the primates superior colliculus and underlying reticular formation in comparison with visual and saccadic cells. *Exp. Brain Res.* 1997; 115: 206-216.

Werner W; Dannenberg; Hoffmann KP. Arm-movement-related neurons in the primate superior colliculus and underlying reticular formation: comparison of neuronal activity with EMGs of muscles of the shoulder, arm and trunk during reaching. *Exp. Brain Res.* 1997; 115: 191-205.

Westby GWM; Keay KA; Redgrave P; Dean P; Bannister M. Output pathways from the rat superior colliculus mediating approach and avoidance have different sensory properties. *Exp. Brain Res.* 1990; 81: 626-638.

Wurtz RH; Albano JE. Visual-motor function of the primate superior colliculus. *Annu. Rev. Neurosci.* 1980; 3: 189-226.

Zupanc GK, Maler L. Neuronal control of behavior plasticity: the prepacemaker nucleus of weakly electric gymnotiform fish. *J. Comp. Physiol. A* 1990; 180: 99-111.

11- Apêndices

Tabelas

Tabela -1: Dados individuais e médios dos parâmetros analisados dos aumentos na frequência da descarga do órgão elétrico (DOE) após a microinjeção de 0,49 mM de bicuculina no teto óptico (TeO) de *Gymnotus carapo*. EPM = erro padrão da média.

Evento (s)	AF (s)	Plateau (s)	RF (s)	TT (s)	MAF (Hz)	FB (Hz)
31,17 - 39,76	0,3	0,15	8,13	8,58	111,11	49,47
49,97 - 53,61	1,47	0,18	3,84	3,62	112,35	49,47
54,44 - 59,32	0,8	0,24	1,97	4,8	120,48	49,47
65,45 - 71,95	0,25	0,32	5,91	6,48	116,95	49,47
97,39 - 100,24	0,25	0,3	2,25	2,8	128,2	49,47
98,87 - 104,11	0,34	0,17	4,73	5,24	161,29	63,67
111,59 - 116,07	0,32	0,3	3,85	4,47	108,69	49,47
113,15 - 119,3	0,24	0,4	6,15	6,79	161,29	34,96
135,90 - 141,47	0,4	0,19	4,98	5,57	161,29	63,67
168,91 - 174,23	0,67	0,21	3,92	4,8	161,29	63,67
218,32 - 222,42	0,3	0,39	3,42	4,11	169,49	63,67
236,63 - 240,55	0,32	0,11	3,78	4,21	169,49	63,67
Média	0,47	0,25	4,41	5,12	136,89	54,18
EPM	0,1	0,03	0,49	0,45	7,25	2,69

Tabela – 2: Dados individuais e médios dos parâmetros analisados dos aumentos na frequência da descarga do órgão elétrico (DOE) após a microinjeção de 0,98 mM

de bicuculina no teto óptico (TeO) de *Gymnotus carapo*. EPM = erro padrão da média.

Evento (s)	AF (s)	Plateau (s)	RF (s)	TT (s)	MAF (Hz)	FB (Hz)
39,98 - 43,22	0,06	0,2	2,98	3,24	129,87	54,34
55,28 - 59,15	0,17	0,23	3,47	3,87	144,92	58,02
65,78 - 72,04	0,45	0,36	5,4	6,21	144,92	51,03
83,75 - 86,26	0,53	0,19	1,79	2,51	138,88	58,02
115,33 - 121,5	0,45	0,12	5,6	6,17	129,87	58,02
117,65 - 123,13	0,25	0,16	5,07	5,48	109,89	54,71
122,24 - 125,33	0,2	0,25	2,64	3,09	117,64	54,34
133,65 - 138,31	0,22	0,29	4,08	4,59	129,87	51,03
157,42 - 160,51	0,16	0,19	2,74	3,09	121,95	54,71
162,94 - 164,35	0,2	0,09	1,12	1,41	185, 185	58,02
174,39 - 178,36	0,21	0,03	3,73	3,97	111,11	54,71
197,23 - 201,22	0,28	0,26	3,45	3,99	112,35	54,71
226,91 - 231,52	0,29	0,16	4,16	4,61	121,95	51,03
229,56 - 234,85	0,15	0,17	4,97	5,29	114,94	54,71
239,54 - 241,58	0,19	0,12	1,73	2,04	116,27	51,03
246,73 - 249,02	0,2	0,27	1,82	2,29	126,58	54,34
260,69 - 264,43	0,51	0,1	3,13	3,74	119,04	54,71
296,92 - 301,02	0,2	0,24	3,66	4,1	120,48	54,71
304,7 - 307,08	0,36	0,12	1,9	2,38	119,04	51,03
344,99 - 349,8	0,16	0,57	4,08	4,81	125	51,03
390,41 - 393,51	0,18	0,3	2,62	3,1	120,48	51,03
604,87 - 607,63	0,3	0,11	2,76	3,17	119,04	51,03
617,48 - 623,65	0,85	0,09	5,22	6,16	108,69	51,03
630,17 - 634,04	0,44	0,08	3,35	3,87	107,52	51,03
701,45 - 705,08	0,29	0,28	3,06	3,63	201,79	51,03
924,06 - 926,89	0, 18	0,28	2,38	2,84	147,06	51,03
948,72 - 950,97	0,21	0,09	1,93	2,23	109,89	51,03
957,52 - 959,35	0,19	0,11	1,53	1,83	107,52	51,03
963,46 - 963,87	0,31	0,08	0,48	0,87	111,11	51,03
982,89 - 985,12	0,15	0,07	1,98	2,2	108,69	51,03
Média	0,3	0,2	3,1	3,82	126,05	53,15
EPM	0,03	0,02	0,24	0,29	3,95	0,46

Tabela – 3: Dados individuais e médios dos parâmetros analisados dos aumentos na frequência da descarga do órgão elétrico (DOE) após microinjeção de 1,96 mM de bicuculina no teto óptico (TeO) de *Gymnotus carapo*. EPM = erro padrão da média.

Evento (s)	AF (s)	Plateau (s)	RF (s)	TT (s)	MAF (Hz)	FB (Hz)
47,08 - 53,24	0,35	0,16	5,65	6,16	112,35	61,97
65,00 - 142,1	0,98	0,07	75,95	77	136,98	61,97
157,84 - 164,24	1,11	0,18	5,19	6,48	121,95	61,97
168,19 - 171,95	0,23	0,12	3,39	3,74	121,95	61,97
178,69 - 213,44	0,23	0,13	34,39	34,75	121,95	61,97
384,15 - 387,51	0,66	0,08	2,62	3,36	125	61,97
403,73 - 478,15	0,03	0,02	60,58	60,63	121,95	61,97
518,69 - 564,09	0,2	0,05	26,14	26,39	131,57	61,97
612,09 - 623,87	0,08	0,31	11,39	11,78	109,89	47,76
617,42 - 620,93	0,42	0,35	2,74	3,51	136,98	61,99
635,1 - 637,99	0,43	0,23	2,23	2,89	133,33	61,99
812,35 - 821,05	0,31	0,43	7,96	8,7	142,85	47,76
911,65 - 945,45	0,06	0,33	33,41	33,8	116,27	47,76
1004,24 - 1016,21	0,33	0,33	11,31	11,97	136,98	47,76
1013,06 - 106,46	0,1	0,28	3,28	3,66	136,98	66,67
1076,52 - 1081,25	0,11	0,23	4,39	4,73	103,09	47,76
Média	0,35	0,21	18,16	18,72	125,63	57,82
EPM	0,08	0,03	5,62	5,61	2,87	1,77

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)