

Registro dos Neurônios H1

Carlos Alessandro Silva dos Anjos

Dissertação apresentada ao Instituto de Física de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências: Física Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Roland Köberle

São Carlos
2006

Anjos, Carlos Alessandro Silva dos

Registro dos neurônios H1 / Carlos Alessandro Silva dos Anjos. - - São Carlos, 2006.

Dissertação (Mestrado) - - Instituto de Física de São Carlos, 2006.

Orientador: Prof. Dr. Roland Köberle

1. Registro de spikes 2. Sistema visual 3. Interação entre H1's I. Título

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de Carlos Alessandro Silva dos Anjos, apresentada ao Instituto de Física de São Carlos, da Universidade de São Paulo, em / /2006

Roland Köberle
IFSC - USP

Jan Frans Willem Slaets
IFSC - USP

Antonio Carlos Roque da Silva Filho
FFCLRP

*Dedico aos meus pais, às minhas avós, à minha
irmã, à minha noiva e aos amigos*

Agradecimentos

Primeiramente eu agradeço a Deus pela saúde, amor, misericórdia e capacidade que me tem dado. Se estou aqui é por Ele e para Ele. Toda glória e louvor seja dado a Deus, meu Senhor e Salvador da minha vida.

A meus pais Carlos Miguel dos Anjos e Elma Silva dos Anjos, a minha irmã Sheysa K. Silva dos Anjos e as minhas queridas avós Olinda e Amélia, pelo apoio e carinho incondicional nesses 27 anos de vida. Eu amo vocês.

A meu orientador, Professor Roland Köberle pela paciência, confiança, dedicação, auxílio e orientação nesse início de vida profissional.

A minha noiva Janaina L. dos S. Pinto, por todos os momentos que estivemos juntos, mesmo na distância, por sempre acreditar em mim. Obrigado pelo seu apoio. Te amo.

Aos técnicos: Lirio Onofre, pela paciência em responder minhas perguntas, Ivanilda H. Zucolotto de Stefani, pelo auxílio em algumas montagens simples que tive que fazer.

Aos colegas de laboratório, Bruna D. L. Pinto (pelo auxílio na montagem das moscas e no Matlab), Nelson Fernandez, Ingrid (companheira nos momentos de aquisição), Ednei Alves (pelo socorro na parte computacional), Maicon, Luiz (pela ajuda no uso da placa Axon) e Natali. Agradeço pelos momentos que passamos nesses dois anos. Que Deus os abençoe.

Aos colegas do Instituto: Daniel, Fabiano, Guilherme, pelos momentos divertidos que passamos. A minha grande amiga Ana Paula, obrigado pelo companheirismo e amizade. Que Deus os abençoe.

Aos colegas de República, pelos momentos que compartilhamos nesses anos, principalmente a José Carlos, que me ajudou em um dos momentos mais complicados que tive por aqui.

As secretárias Maria Cristina Vieira Ligo da Silva, Wladerez Aparecida Gounella Caiado e Elizabeth Cristiana Conti, pelo auxílio nas tarefas burocráticas.

As funcionárias da biblioteca do Instituto de Física de São Carlos.

E, ao CNPQ pelo apoio financeiro.

Ainda que eu tenha o dom de profetizar e conheça todos os mistérios e toda a ciência; ainda que eu tenha tamanha fé, a ponto de transportar montes, se não tiver amor, nada serei.

I CO 13:2

Resumo

Em um dos estágios do processamento visual da mosca - a placa lobular, uma para cada hemisfério da cabeça da mosca - nós encontramos neurônios dedicados à detecção e processamento do auto-movimento. Um destes neurônios, chamado H1, detecta o movimento de trás para frente na horizontal e os dois neurônios de cada lado da cabeça interagem, melhorando a extração da informação sobre o estímulo gerado pelo ambiente.

Neste trabalho nós apresentamos uma instalação experimental de registro simultâneo dos dois neurônios H1, discutimos as dificuldades associadas com este esforço e os dados preliminares obtidos.

Os spikes gerados pelos neurônios H1 são registrados extracelularmente com elétrodos de tungstênio, alimentam um head-stage, um pré-amplificador e um discriminador, todos dispositivos eletrônicos analógicos, para serem processados em um digital, a fim de registrar os tempos de chegada dos spikes com precisão de microssegundos. O hardware analógico e o digital são controlados pelo software Linux RealTime, baseados em RTLinux.

O sistema de aquisição dos spike-times possui três canais de entrada e um de saída: uma entrada para cada H1 e um para sincronização e uma saída para o envio do estímulo com 16 bits de resolução, que consiste no movimento horizontal de uma tela fixa.

Nós discutiremos as dificuldades encontradas durante os testes/eliminação dos erros do equipamento. Estas têm sua origem em ter que controlar o "wetware" biológico e no hard/software eletrônicos.

Abstract

In one of the fly's optical processing stages - the lobula plate, one for each hemisphere of the fly's head -, we find neurons dedicated to the detection and processing of self-motion. One of these neurons, called H1, detects horizontal back-to-front motion and the two neurons of each side of the head interact, improving the extraction of information about the stimulus generated by the environment.

In this work we present an experimental setup to record simultaneously from the two H1 neurons, discuss the difficulties associated with this endeavour and preliminary data obtained.

The spikes generated by the H1 neurons are picked up extracellularly with Tungsten electrodes, are feed via a head-stage, a preamplifier and a discriminator, all electronic analog devices, to be processed from here on digitally, in order to register the spike arrival times with microsecond precision. The analog and the digital hardware, based on RTLinux, are controlled by Linux RealTime software.

The spike-time acquisition system has three input and one output channel: one input for each H1 and one for sinchronization and one output for delivering the stimulus with 16 bits resolution, consisting of the horizontal positions of a rigidly moving picture.

We discuss the difficulties encountered during the testing/debugging of the equipment. These have their origin both having to control the biological "wetware" and the electric hard/soft-ware.

Sumário

Lista de Figuras

1	Introdução	13
2	Sistema Visual	16
3	Aquisição de Dados	21
3.1	Descrição da Experiência	21
3.2	Aquisição de Dados	23
3.3	Geração de Estímulos	25
4	Metodologia	28
4.1	Testes	28
4.2	Filtros Lineares	37
4.2.1	Filtro Passivo Passa-Alta	38
4.2.2	Filtro Passivo Passa-Baixa	39
4.2.3	Filtro Ativo	41
5	Resultados	42
5.1	Resultados dos Testes	42
5.2	Raster	44
5.3	Taxas de Disparo	45
6	Conclusões	47

Referências	49
Anexo A - Classe dos Insetos \Rightarrow Ordem Diptera	50

Lista de Figuras

1	O olho composto da mosca	16
2	Representação esquemática do sistema visual da mosca - corte lateral . . .	17
3	Células tangenciais da placa lobular da Calliphora. As setas à direita indicam a direção preferencial (setas fechadas) e direções nulas (setas abertas) das células. Diâmetro médio das células é de 10 μm . A: anterior; P:posterior	19
4	Moscas abertas: A - Mosca antes dos eletrodos. B - Mosca pronta para a aquisição	21
5	Em azul temos a velocidade da tela a cada 2ms e em vermelho as posições da imagem na tela a cada 2ms. O raster para este estímulo pode ser visto na figura 19.	22
6	Esquema do front end analógico do sistema de aquisição.	23
7	Esquema do sistema de aquisição	24
8	O equipamento (a - discriminador; b - osciloscópios; c - placa chaveadora; d - caixas de som; e - PC com RTLinux; f - hardware dedicado; g - contador de spikes; h - monitor; i - a mosca preparada para a aquisição)	26
9	Exemplo do estímulo mostrando a parte aleatória e a parte repetida	27
10	Taxa de disparo do lado direito 48 spk/seg e esquerdo 39 spk/seg. Observamos que o lado direito tem muito mais spikes	29
11	Esquema fora de escala para representar o sistema de aquisição como foi montado primeiramente. O teste da parte analógica do sistema de aquisição foi feito baseado nesse esquema. Esse esquema vale para a mosca virtual e a verdadeira.	32
12	Tela do programa AxonScope responsável pela aquisição analógica do sinal dos H1. A tela de cima é o eletrodo esquerdo e a de baixo é o eletrodo direito. Nota-se a ausência de alguns spikes presentes na aquisição analógica.	33

13	Mosca virtual. a - a mosca virtual vista lateral, b - o spike eletrônico, c - gerador de spikes eletrônicos, d - a mosca virtual vista de cima.	35
14	Mostra a presença de spikes duplos devido a alta frequência associada os sinal do H1	36
15	Comparação entre os spikes com e sem os filtro. O spikes da esquerda está sem o filtro e o da direita está com o filtro	37
16	Filtros passivos. a - Filtro passivo passa-baixa com frequência de corte de(4khz), b - o filtro passivo passa-alta te frequência de corte 3Khz	39
17	Filtro ativo tipo Bessel terceira ordem com corte entre 300Hz e 5KHz	40
18	O raster de duas aquisições com o mesmo estímulo. As repetições dos lados direito e esquerdo são em relação ao eletrodo - A: raster de uma aquisição que tem muitos spikes duplos e com uma taxa de disparo ruim para uma aquisição de 11minutos. B: raster de uma aquisição no qual tivemos uma pequena quantidade de spikes duplos.	42
19	Raster de um estímulo de onda quadrada no qual tivemos taxa de disparo esquerda 20 spk/seg e taxa de disparo direita 28spk/seg	43
20	A figura mostra o estímulo e dois rasters feitos com moscas diferentes, mostrando a reprodutibilidade.	44
21	Taxa de disparo para diferentes tempos de correlação junto com a calibração. O valor -1 no eixo X é o valor da taxa de disparo para a calibração	46
22	Exemplo de um coleópetro espécie <i>Streptocerus speciosus</i>	51

1 *Introdução*

A razão da escolha da mosca está no fato de ser um sistema simples, que permite transportar as técnicas experimentais e teóricas da física para a pesquisa biológica e assim fazer experimentos *in vivo*, os quais podemos executar e analisar num contexto de muitos parâmetros, onde todos são aparentemente necessários e precisam ser controlados com o mínimo de interferência no comportamento do organismo.

Quando os experimentos são repetidos nas mesmas condições, os resultados podem ser reproduzidos dentro de erros toleráveis e do inevitável ruído biológico. A mosca é um animal de fácil manipulação e criação em laboratório e nos possibilita realizar aquisições por longos períodos de tempo.

Estamos interessados na ordem Diptera, mais especificamente nas moscas da espécie *Chrysomia Megacephala* que devido aos exaustivos estudos das últimas décadas, tanto no aspecto neurofisiológico [3, 8], como no aerodinâmico [5] nos deu um certo conhecimento sobre suas propriedades.

A mosca usa a informação visual, sua fantástica aerodinâmica e seu mecanismo de vôo extremamente eficiente, para realizar acrobacias aéreas, que lhe permitem fugir de predadores ou perseguir outras moscas para o acasalamento, etc. Em caso de perseguição a outra mosca, a mosca que persegue deve estimar a posição instantânea da outra e a partir dessa imagem ajustar sua velocidade angular de modo a reduzir a distância entre elas. Mas como a mosca usa essa informação, que é codificada por seus neurônios, para interpretar seu próprio movimento, e assim fugir dos predadores ou perseguir outras moscas?

Para investigar alguns aspectos de como a mosca codifica e interpreta seu próprio movimento é necessário entender melhor como se dá a interação entre alguns neurônios do seu sistema visual. Então precisamos de um sistema de aquisição de sinais neurais que possa registrar os tempos dos spikes (potenciais de ação) dos dois neurônios H1 simultaneamente, quando submetidos a um mesmo estímulo.

O H1 é um neurônio do sistema visual da mosca localizado na placa lobular (um dos

estágios do seu sistema visual), ele é de fácil reconhecimento devido ao seu tipo de resposta a estímulos visuais. A resposta se dá através da geração de pulsos (spikes = potenciais de ação) possibilitando aquisições eletrofisiológicas extracelulares. Existem dois H1, cada um localizado na placa lobular de cada hemisfério da cabeça da mosca. O H1 é responsável pela detecção de movimentos horizontais no sentido trás para frente, e faz parte de um mecanismo de detecção de velocidade, que pode servir para medir seu auto movimento, a rotação e a translação.

Pensando no estudo da interação entre os H1, que através do fluxo ótico pode dar informações sobre o auto movimento da mosca, implementamos um sistema de aquisição de sinais neurais multicanal de tempo real, com uma resolução temporal de aproximadamente $25\mu\text{s}$ para os tempos dos spikes. Para termos essa precisão usamos um computador que utiliza um sistema operacional de tempo real (RTLinux free kernel 2.4.4) e um hardware dedicado externo, que utiliza o porto paralelo (LPT1) como meio de comunicação com o computador que é o responsável pela medida e registro dos tempos de ocorrência dos spikes.

O sistema de aquisição possui três canais de entrada e sua resolução temporal é limitada pelos tempos de latências de software e hardware do computador para o atendimento de interrupções. A interrupção ocorre com a chegada de um sinal ao discriminador, o que libera um processo no computador para registrar o tempo de ocorrência desse sinal (no caso um spike de um dos neurônios ou um sinal do sistema de sincronismo de geração de imagens). Dos três canais, um é utilizado para o registro e sincronismo do sistema de geração de imagens de estímulo, que a cada 2ms muda a mesma tela para uma posição diferente no monitor. Os outros dois canais são para o registro dos instantes de ocorrência dos spikes dos neurônios. O sistema conta também com uma saída analógica com resolução de 16 bits para a geração de estímulos visuais.

No Capítulo dois faremos uma breve descrição do sistema visual da mosca e das propriedades do H1, e a explanação de suas interações com outros neurônios.

No Capítulo três apresentaremos o preparo da experiência em si, algumas propriedades do sistema de aquisição e a geração de estímulos.

No Capítulo quatro, os testes feitos com o equipamento para validá-lo, assim como as dificuldades apresentadas e as possíveis soluções, seguidos de uma breve descrição de filtros passivos e ativos.

No Capítulo cinco apresentaremos alguns resultados simples, como os rasters e as

taxas de disparo para alguns estímulos.

E no Capítulo seis informaremos algumas conclusões sobre o que foi feito e o que poderemos fazer futuramente.

E finalmente, um pequeno apêndice falando da ordem das dipteras.

2 *Sistema Visual*

Conhecer algumas propriedades básicas do sistema neural da mosca e o papel de determinados neurônios no processo da codificação da informação visual é fundamental para a compreensão do nosso trabalho.

O sistema visual da mosca pode ser dividido em: retina, lamina, medula, lóbula e placa lobular (ver figura 2). Todos estes estágios são formados por regiões que refletem a posição relativa dos omatídeos no olho. Portanto, as imagens visuais captadas pelo olho são projetadas retinotopicamente nos estágios seguintes de tal forma que as relações de vizinhança entre pontos da imagem são conservadas dentro do sistema nervoso [3, 12]



Figura 1: O olho composto da mosca

A informação visual começa a ser codificada nos olhos (figura 1). Na mosca, os olhos são formados por aproximadamente 5000 omatídeos por olho composto. O omatídeo é um pequeno olho, então a imagem percebida pela mosca é uma combinação da informação recebida pelos vários omatídeos que formam o olho composto da mosca. O eixo óptico de cada omatídeo possui orientação precisa em relação aos seus vizinhos. Como o olho da mosca é "formado por vários olhos pequenos (omatídeos)" não existe uma lente central ou retina resultando em uma má resolução da imagem, no entanto, ela consegue detectar movimentos rápidos e a polaridade da luz.

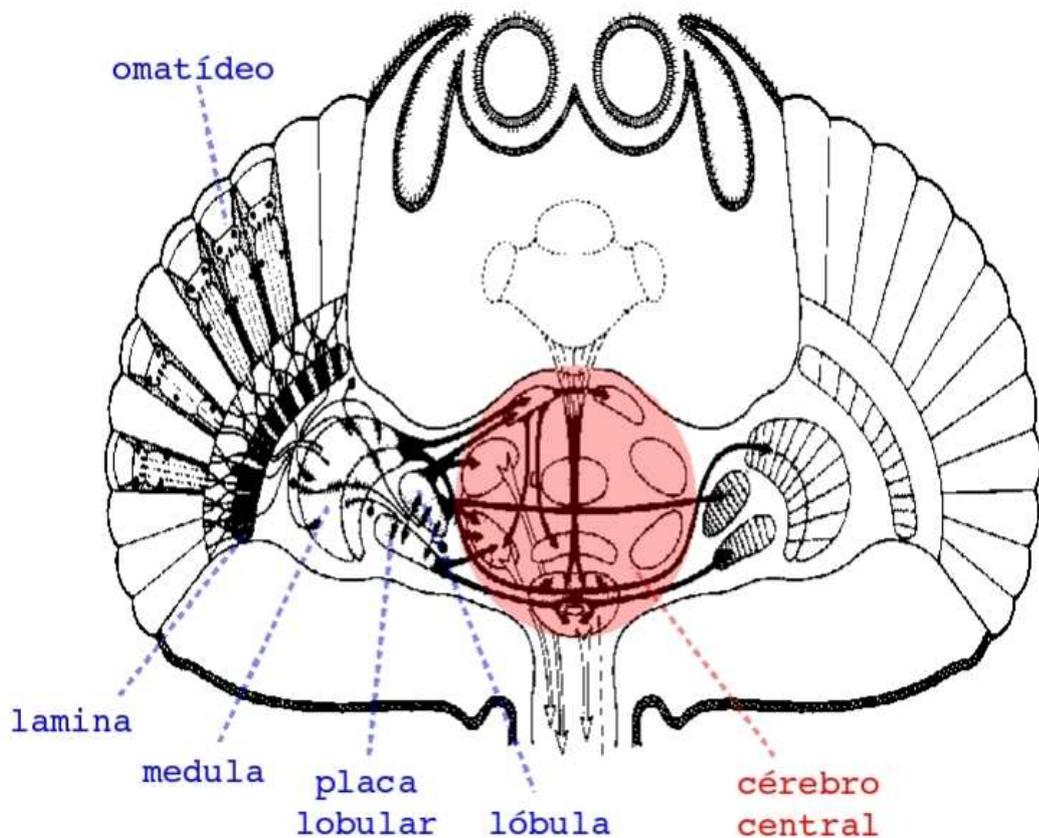


Figura 2: Representação esquemática do sistema visual da mosca - corte lateral

A transformação da luz em sinal elétrico ocorre através da absorção de fótons por um pigmento visual presente nas células foto-receptoras, o 3-hidroxi-retinal, que é ligado a xantopsina. Essa proteína se deforma quando absorve um fóton, desencadeando um complexo processo bioquímico que resulta na despolarização da membrana celular da célula foto-receptora [14, 15].

Cada omatídeo consiste de uma lente e de um rhabdomero. O omatídeo tem o formato hexagonal e é constituído por um conjunto de oito células foto-receptoras, duas centrais (R7 e R8) e seis periféricas (R1-R6). As células periféricas (R1-R6), têm a mesma sensibilidade espectral, com picos na região do UV. A célula R7 tem o pico de absorção na região do UV (ultravioleta) e a R8 na região do azul ou verde [4].

Os foto-receptores R1-R6 de omatídeos vizinhos têm eixos óticos paralelos. Os sinais destes seis foto-receptores são combinados no primeiro gânglio ótico, a lamina. Os outros dois, R7 e R8, não têm conexão ao nível da lamina e vão direto para o próximo nível, a

medula. A luz atravessa uma lente de $30\mu\text{m}$ de diâmetro que a projeta no final de uma estrutura cilíndrica denominada rhabdomero. Os rhabdomeros das células foto-receptoras são óticamente isolados e cada um deles recebe luz de uma determinada posição do campo visual.

Os foto-receptores periféricos (R1-R6) projetam seus axônios na mesma região da lamina, que é o próximo estágio do processamento visual. Os foto-receptores de omatídeos vizinhos convergem para um mesmo ponto da lamina conhecido como coluna laminar.

Na lamina o sinal dos foto-receptores é invertido, amplificado e filtrado de maneira que apenas a variação da intensidade da luz seja codificada. Codificando apenas o contraste [10] a mosca evita o problema de ter que acomodar cinco ordens de grandeza de intensidade de luminosa, que é a variação típica de um dia.

A medula foi pouco estudada devido ao tamanho diminuto de suas células, que dificulta aquisições eletrofisiológicas, mas há evidências de que algumas células estejam envolvidas na detecção do movimento no campo visual [6].

A lóbula recebe informação de uma grande quantidade de células da medula e pouco se sabe sobre sua função no sistema visual. Mas há fortes evidências de que ela esteja envolvida na detecção de movimento. Isto devido ao fato de ter neurônios sensíveis ao movimento que só as moscas macho possuem [6], indicando a possibilidade de que a lóbula esteja envolvida na detecção e perseguição de pequenos objetos no campo visual, função que os machos desempenham melhor que as fêmeas [9].

Na placa lobular há cerca de 60 neurônios grandes (diâmetro de $10\mu\text{m}$ em média), que são responsáveis pela detecção de movimento em determinadas direções e sentidos. Eles são classificados de acordo com a direção e sentido preferenciais, modos de resposta e propriedades de integração do estímulo.

Os neurônios que respondem por meio de potenciais de ação (spikes), projetam seus axônios ou no hemisfério contralateral (que é o caso do H1) ou no cérebro central [7] como indica a figura 3. O H1 e o V1 (figura 3) respondem através de potenciais de ação. A classificação pela direção e sentido preferenciais é horizontal (H) e vertical (V). E em relação às propriedades de integração, a maior parte das células identificadas responde melhor quanto maior for o tamanho do padrão visual.

Desses sessenta neurônios da placa lobular, temos um interesse maior no H1, que é sensível a movimentos na direção horizontal sentido "trás para frente", codificando a informação através de spikes, e que projeta seu axônio na placa lobular do hemisfério

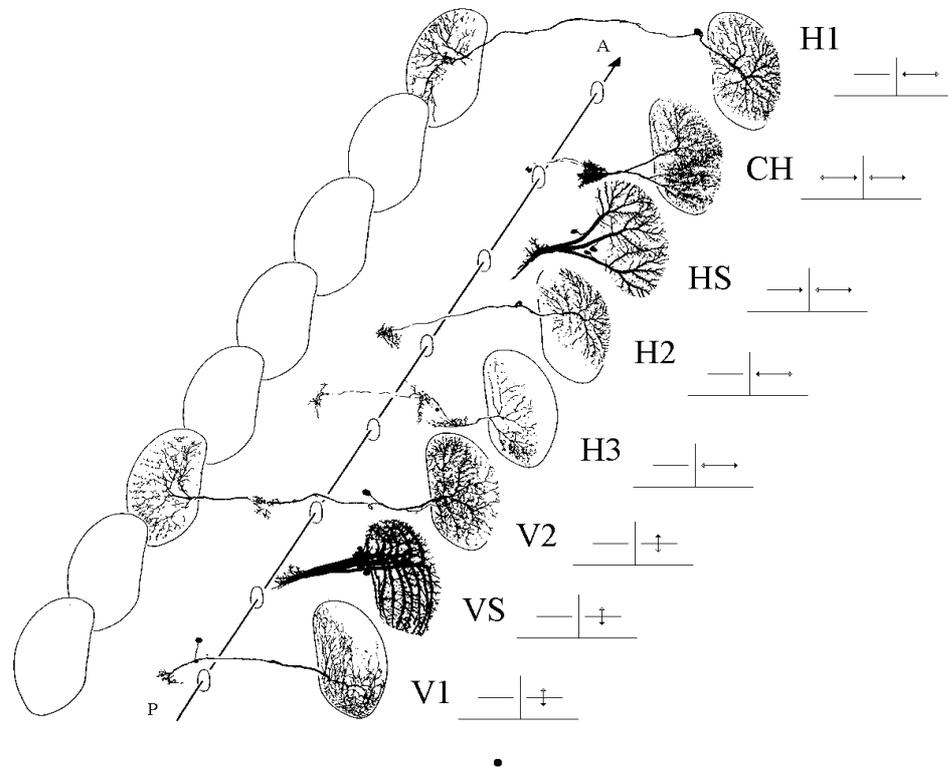


Figura 3: Células tangenciais da placa lobular da *Calliphora*. As setas à direita indicam a direção preferencial (setas fechadas) e direções nulas (setas abertas) das células. Diâmetro médio das células é de $10 \mu\text{m}$. A: anterior; P:posterior

contralateral.

O H1 dispara pulsos o que facilita as aquisições eletrofisiológicas, não sendo necessário fazer aquisições intracelulares. Além disso, na placa lobular não existe outro neurônio com as mesmas propriedades do H1. Ele responde a estímulos em praticamente todo o campo visual devido ao fato de que sua rede dendrítica cobrir toda a placa lobular, o que facilita a identificação pela sua resposta eletrofisiológica [7].

O H1 codifica informação sobre a velocidade da imagem, direção e sentido preferenciais e também é sensível a outros parâmetros como contraste e tamanho da imagem [2].

A interação entre os H1 pode nos permitir entender como a mosca codifica seu movimento. No caso sabemos que quando a mosca está virando a cabeça temos uma resposta máxima de um de seus H1, pois quando um H1 é excitado, ele através do CH e do HS inibe o outro. No caso da translação a resposta é mínima, pois a direção do estímulo é

contrária à direção de excitação ou caso contrário um H1 inibe o outro fazendo com que tenhamos uma resposta mínima. Mais detalhes de como funciona a interação entre os H1, CH e HS em [13].

3 Aquisição de Dados

3.1 Descrição da Experiência

Utilizamos moscas criadas em laboratório a fim de controlar sua idade, preferencialmente moscas da espécie *Chrysomia Megacephala* de 5 a 15 dias de vida, cujo ciclo vital é de mais ou menos "30 dias".

Após a mosca estar fixada com cera em um tubo plástico, retiramos cirurgicamente a quitina da parte posterior de sua cabeça, de ambos os hemisférios. Também retiramos uma camada de gordura que cobre o local, e um músculo que se encontra na região para evitarmos a contaminação da aquisição pelos spikes gerados por esse músculo, figura 4.A.

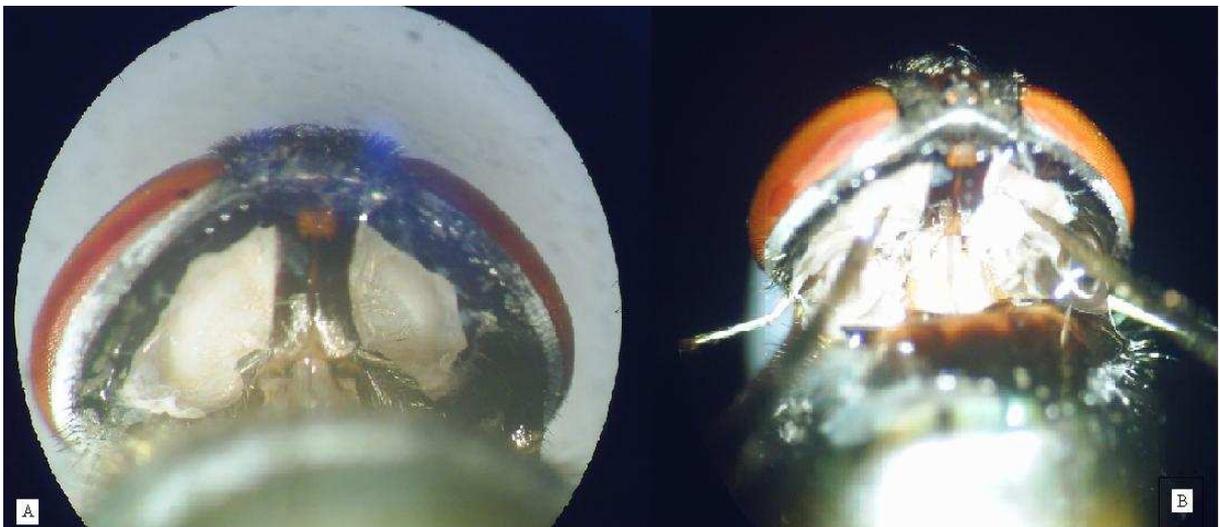


Figura 4: Moscas abertas: A - Mosca antes dos eletrodos. B - Mosca pronta para a aquisição

A mosca é levada a outra mesa onde introduzimos dois eletrodos de tungstênio em sua cabeça, sendo um de cada lado, para registrar os pulsos emitidos pelos H1's (figura 4.B). A identificação é feita através de seu modo de resposta, de sua direção e sentido

preferencial e da sensibilidade espacial, que abrange praticamente todo o campo visual.

O sinal é encontrado no axônio do H1. O estímulo visual é apresentado do lado direito mas o sinal do H1 é registrado pelo eletrodo do lado esquerdo (contralateral), o mesmo vale quando apresentamos o estímulo visual do lado esquerdo e o sinal do H1 é registrado pelo eletrodo direito. Uma vez que encontramos o sinal do H1 de um dos lados procuramos o sinal do outro lado tomando o devido cuidado de não interferir no primeiro sinal encontrado, evitando a presença de sinais cruzados, pois existe a possibilidade de pegarmos o contralateral (o H1 está no hemisfério oposto ao que está recebendo o estímulo visual) e o ipsilateral (O H1 está no mesmo hemisfério que está recebendo o estímulo visual) no mesmo eletrodo, e de outros neurônios (por exemplo, os verticais). Uma vez que encontramos os sinais de ambos os H1's, podemos realizar, com um pouco de sorte, até 15 horas de aquisição extracelular estável e sem interrupções.

Para calibrar o sistema que gera os estímulos usamos um estímulo que não privilegia nenhum dos H1 para centralizarmos o monitor. Esse estímulo tem a forma de uma onda quadrada, ver figura 5, de forma que estimulamos um H1 por vez. Tentamos igualar as taxas de disparo dos neurônios movendo o monitor horizontalmente (direita ou esquerda). Como os H1's são diferentes, eles têm taxas de disparo diferentes, então temos que olhar o nosso contador de spikes durante alguns minutos para podermos enxergar essa "igualdade" entre as taxas de disparo dos H1's.

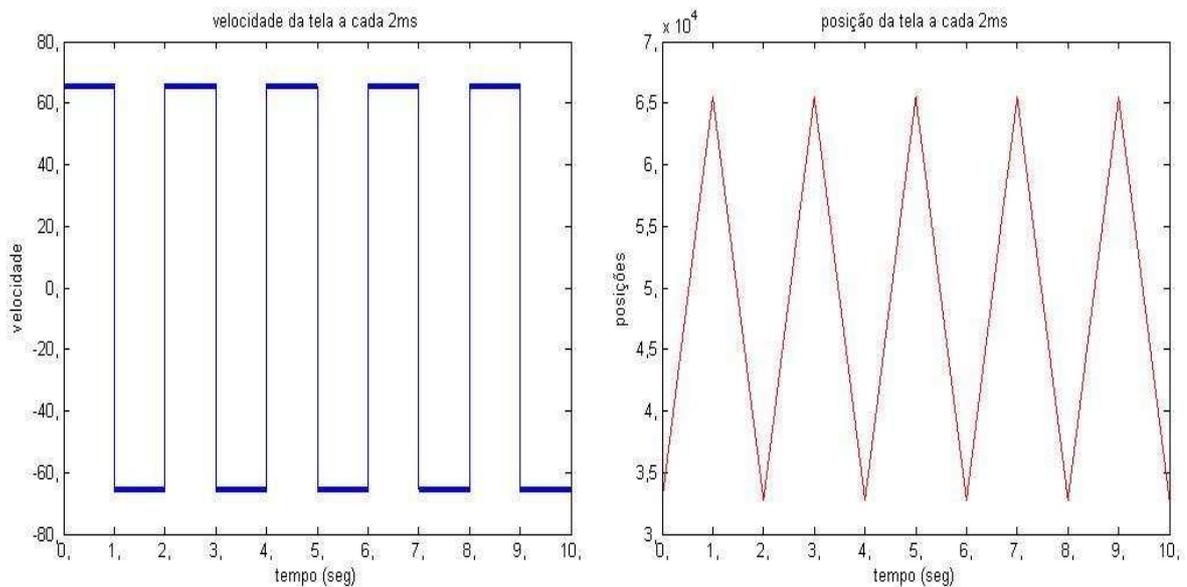


Figura 5: Em azul temos a velocidade da tela a cada 2ms e em vermelho as posições da imagem na tela a cada 2ms. O raster para este estímulo pode ser visto na figura 19.

Uma vez com os sinais encontrados e com o monitor centralizado, mostramos para a mosca um estímulo visual, que se move na horizontal. No caso do teste do sistema de aquisição usamos estímulos descorrelacionados e outros quatro com tempos de correlação de 4, 8, 12 e 16ms sendo todos com média zero.

3.2 Aquisição de Dados

A aquisição dos tempos dos spikes é feita extracelularmente através da resposta do H1 que é obtida através de um eletrodo de tungstênio (modelo FHC - UEWSHGSEKP1M) com impedância entre 2 e 5 $M\Omega$ colocado na região de projeção do axônio do H1, no hemisfério contralateral (no hemisfério oposto ao que está recebendo o estímulo visual), então o eletrodo esquerdo pega o sinal do neurônio direito e o eletrodo direito pega o sinal do neurônio esquerdo.

O sistema é formado pelo head stage, pré-amplificador, filtro, discriminador, hardware dedicado e computador com sistema operacional RTLinux free. O sistema conta também com uma saída analógica com resolução de 16bits para a geração de estímulos, discutida adiante.

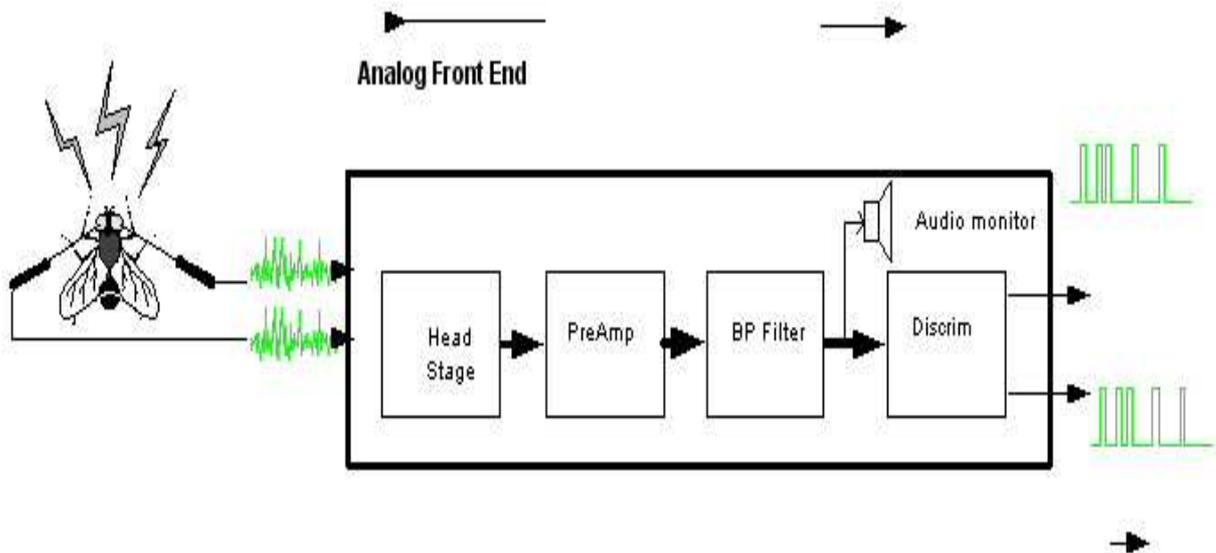


Figura 6: Esquema do front end analógico do sistema de aquisição.

Com a atual configuração temos uma precisão da ordem de $25\mu s$, essa precisão pode variar conforme as características do computador, tais como, a velocidade do clock da CPU, latências de hardware etc.

O sistema pode ser dividido em uma parte analógica (Analog Front End) e outra digital. A parte analógica é formada pelo head stage, pré-amplificador, o filtro passa-faixa e o discriminador (versão final do sistema de aquisição multicanal). O discriminador faz a ligação entre a parte digital e a analógica. A parte digital é formada por um hardware dedicado em comunicação com o computador. Na figura 6 temos um esquema da parte analógica do sistema, na figura 7 temos o esquema do sistema de aquisição e na figura 8 uma foto do sistema de aquisição.

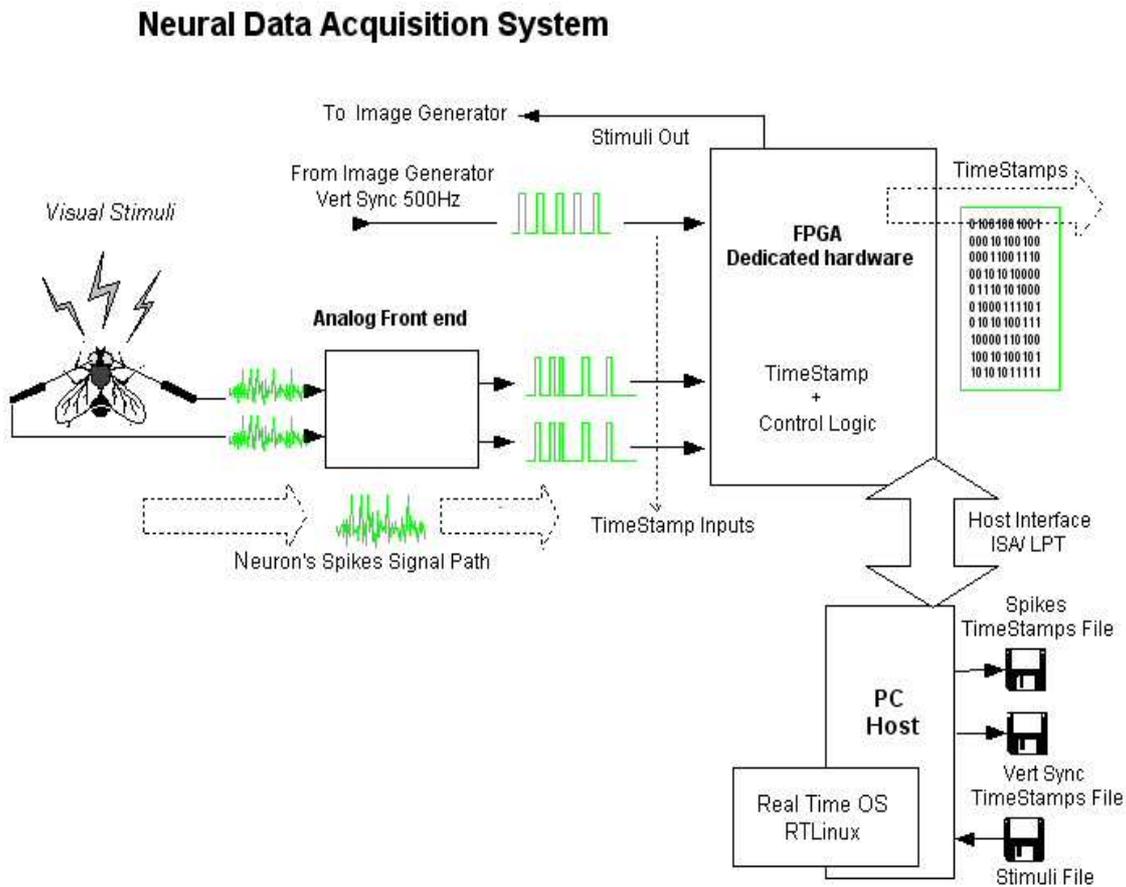


Figura 7: Esquema do sistema de aquisição

O sinal do neurônio do sinal do H1 (é da ordem de $100 \mu\text{v}$) é amplificado cerca de 10 mil vezes em seguida filtrado (por um filtro ativo tipo Bessel de terceira ordem com frequência de corte entre 300hz e 5Khz), e depois processado por um discriminador de pulsos, que detecta a ocorrência de um pulso quando um sinal ultrapassa um certo limiar de tensão. Esse limiar é ajustado manualmente levando em conta a relação sinal ruído (SNR), ou seja, a variação de amplitude do sinal.

O hardware dedicado recebe três sinais de entrada, que são: o sinal do neurônio

direito, o sinal do neurônio esquerdo e o sinal de sincronismo do sistema de geração de estímulo. Os sinais são assíncronos, então uma das tarefas do hardware dedicado é a sincronização com o circuito gerador do relógio interno e armazenar em registro.

O sinal que chega a qualquer entrada do hardware dedicado gera um pedido de interrupção ao microcomputador com RTLinux. Entre o pedido de interrupção e a primeira instrução da rotina do software no computador existe um período de latência que no caso é de $\pm 4\mu s$. No caso de chegada em canais diferentes temos o registro do tempo simultaneamente. Caso dois sinais cheguem em um mesmo canal dentro do tempo de latência da rotina, o segundo é armazenado em um registro intermediário e liberado após o término da rotina de interrupção, gerando um novo pedido de interrupção para o registro do segundo sinal.

O sistema operacional RTLinux, instalado no computador, adiciona uma camada no kernel do Linux que toma o controle das interrupções do sistema, adicionando uma camada de hardware virtual entre o kernel e o hardware.

Quando o computador executa a rotina de interrupção, ele verifica o registro do hardware dedicado para identificar o canal que gerou o pedido, e executa a leitura do registro TSC (Timer Stamp Counter) e registra o instante do evento. O TSC é um registrador de 64bits, de alta precisão para medição de tempos em PC, que conta os ciclos do clock da CPU desde a inicialização do processador. Assim a ocorrência do pulso é registrado para análise posterior.

3.3 Geração de Estímulos

Durante o experimento a mosca observa uma imagem que se movimenta na direção horizontal em um monitor de vídeo (Modelo Tektronics 608). A posição da imagem é modificada a cada 2ms, pelo computador que controla a experiência usando uma seqüência de posições previamente definidas.

O sistema de vídeo transforma cada posição, de 16 bits de resolução, em uma tensão correspondente entre 0 e 5 volts, que é aplicado ao controle de posição horizontal do monitor, alterando a posição da imagem. Não há movimento na vertical e a taxa de varredura do monitor é de 500Hz. A imagem pode ter o tamanho máximo de 256 X 256 pixels, com 256 pixels de intensidade, sendo a área útil do monitor de vídeo de 9 X 11cm.

Utilizamos o Matlab (Matlab7.0.1. Mathworks) para gerar os estímulos com uma



Figura 8: O equipamento (a - discriminador; b - osciloscópios; c - placa chaveadora; d - caixas de som; e - PC com RTLinux; f - hardware dedicado; g - contador de spikes; h - monitor; i - a mosca preparada para a aquisição)

distribuição gaussiana para a velocidade, com media zero e com vários valores de tempo de correlação. No caso usamos 0, 4, 8, 12 e 16 ms de tempo de correlação, e mais um estímulo de onda quadrada para a calibração, mostrado na figura 5.

A duração de cada estímulo é de 20 segundos, sendo que ele é repetido 120 vezes, nos dando um tempo total de 40 minutos para a experiência. Dos 20 segundos do estímulo, os 10 primeiros segundos são sempre repetidos e os 10 segundos restantes são aleatórios, para cada vez que o estímulo é repetido, os 10 segundos finais são diferentes. Dos 10 segundos iniciais temos que os 5 segundos finais são o inverso dos 5 iniciais, como pode ser visto na figura 9. No caso do estímulo em onda quadrada temos uma velocidade constante de 128 mm/s em um segundo e no posterior -128 mm/s.

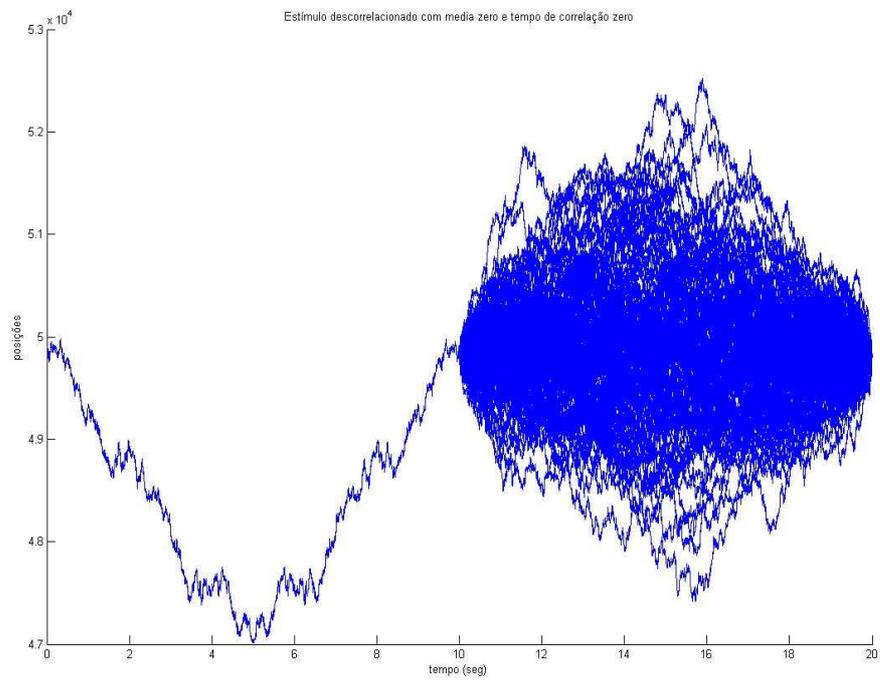


Figura 9: Exemplo do estímulo mostrando a parte aleatória e a parte repetida

4 *Metodologia*

4.1 Testes

A experiência exige vários cuidados no início, como:

- A procura dos sinais tem que ser a mais precisa possível, pois o H1 esquerdo projeta seu axônio até o lado direito, e vice e versa, assim podemos encontrar o sinal do H1 direito e do esquerdo no esquerdo no mesmo eletrodo.
- Tendo encontrado o sinal de um dos lados, devemos ter cuidado durante a procura do sinal do outro lado, pois, podemos perder o sinal do neurônio já encontrado, devido a comunicação entre os lados da cabeça da mosca.
- Sinais de outros neurônios próximos que podem "contaminar" a aquisição, pois na região da placa lobular temos outros neurônios que também liberam pulsos quando estimulados, por exemplo o V1.
- Temos que ter uma boa relação sinal ruído(SNR) para ambos os canais do sistema.

Uma vez contornados os problemas iniciais significa que conseguimos um bom sinal. Mas quando fizemos as primeiras aquisições nos deparamos com alguns problemas que requeriam soluções. São eles:

- O monitoramento dos sinais de saída e entrada do discriminador ficou mais complicado, pois tínhamos seis canais para acompanhar (dois - esquerdo e direita - canais para os spikes digitalizados, dois canais para o monitoramento do sinal analógico e dois para acompanhar o nível mínimo de disparo do discriminador), e somente dois osciloscópios.
- As taxas de disparo muito diferentes dos neurônios, os quais acreditávamos serem simétricos, uma vez que eles estavam submetidos a um estímulo descorrelacionado e

com média zero. Essa diferença nas taxas de disparo acabava "poluindo" os raster, pois, um lado sempre tinha muito mais spikes do que o outro fazendo com que o raster ficasse muito denso de um lado, e assim não permitisse enxergar as estruturas que deveriam aparecer devido à direção preferencial de cada neurônio (figura 10).

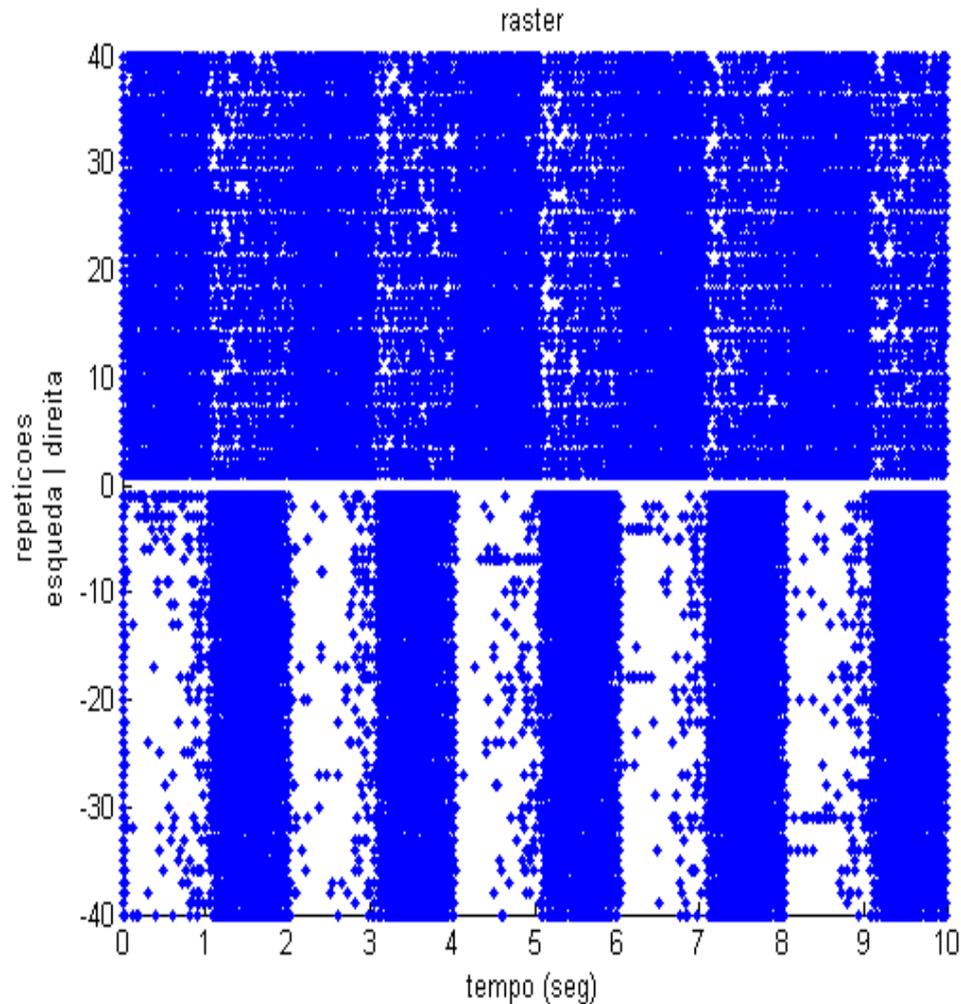


Figura 10: Taxa de disparo do lado direito 48 spk/seg e esquerdo 39 spk/seg. Observamos que o lado direito tem muito mais spikes

- Apareceram spikes com intervalos de tempo menores que o tempo de relaxação dos neurônios que é de ± 2 ms, o que sugeriu testes no equipamento.
- As moscas sobrevivem pouco tempo com os dois lados da cabeça aberta, fazendo com que tenhamos menos tempo para as aquisições.
- Surgiu o fato de termos algumas moscas estressadas, o que dispara um dos H1 de forma constante, independente do estímulo, o que pode ser visto na figura 10.

Tentamos abordar cada problema individualmente de forma que ficasse mais simples entender o que estava ocorrendo. Os problemas de cunho biológico são de difícil resolução, mas os eletrônicos podemos contornar, então partimos para entender o que estava ocorrendo.

Começamos resolvendo o problema do monitoramento dos canais do discriminador, para isso fizemos um chaveador para monitoramento dos canais (uma placa que muda entre os canais, ou seja, entre os eletrodos esquerdo e direito). Cada um dos canais (que são dois) do chaveador, nos permite ver: a saída do head stage (sinal analógico do H1), o sinal que vai para o hardware dedicado (sinal já digitalizado) e o limiar mínimo de disparo (o valor mínimo de tensão o qual o discriminador enxerga a ocorrência de um spike). Isso permitiu um melhor acompanhamento sem a necessidade de novos equipamentos.

Outra possibilidade, foi o uso de uma placa da axon para esse acompanhamento, o que foi implementado posteriormente. Esta placa permite olhar até 16 canais simultaneamente, também permite a realização de aquisições eletrofisiológicas usando o programa AxonScope. O Axonscope grava todo o sinal analógico do H1 (toda a curva), assim podemos retirar os tempos dos spikes usando o Matlab posteriormente. Fizemos algumas aquisições, usando essa placa da Axon, para verificar a presença dos spikes que apareciam com intervalos de tempo menores que 2ms, o que discutiremos mais adiante.

Para tentar acompanhar a quantidade de pulsos disparados e para ajudar na centralização do monitor usamos um contador de spikes (ver figura 8) que nos dá uma taxa de disparo aproximada em tempo real. Esse contador, conta quantos spikes há em uma janela de tempo de nove segundos e mostra esse valor durante aproximadamente 1 segundo, o que nos dá uma noção aproximada da taxa de disparo de cada H1.

Após termos melhorado a forma de monitorar o equipamento, termos uma forma de observar a taxa de disparo aproximada de cada H1, de forma isolada e em tempo real, passamos a abordar a situação mais complicada que foi o surgimento de spikes com menos de 2ms de intervalo entre eles. Isso não deveria ocorrer, pois o tempo de ocorrência de um spike é de mais ou menos 1ms e o neurônio precisa de mais 1ms de "descanso" para liberar outro spike, assim não poderíamos ter intervalos entre spikes com menos de 2ms.

Nós tínhamos alguns suspeitos a averiguar: outros neurônios poluindo as aquisições (de repente a localização dos eletrodos precisaria ser revista devido à possibilidade de estarmos pegando alguns dos verticais), o discriminador (algum problema de hardware) ou ruídos externos (problema de aterramento, uma fonte externa de ruído, sinais cruzados). Então os abordaremos individualmente.

Começamos por procurar nas moscas um outro lugar para pegarmos o sinal do H1, então montamos várias moscas e pegamos o sinal do H1 em locais diferentes da placa lobular para ver se o problema era na posição dos eletrodos, pois este poderia estar pegando outros neurônios, que apesar de não responderem na direção do H1, liberam pulsos aleatórios, como no caso do V1. Verificamos que apesar da troca de lugar dos eletrodos ou da impedância dos eletrodos, a presença dos spikes com menos de 2ms continuava, indicando - nos a procurar algo no hardware.

Esgotadas as possibilidades com as moscas, passamos a investigar o hardware. Começamos procurando algo na parte analógica, entre os Head Stage e o discriminador (nessa época sem o filtro tipo Bessel). Fizemos alguns testes para ver se o sinal de um lado estava contaminando o outro, ou seja, se o sinal do lado direito estava passando para o outro esquerdo, ou o contrário, em algum ponto do front end analógico.

O teste da parte analógica consistia de: estando com sinal dos dois lados, nós desconectávamos em alguns pontos, nos quais achávamos que o sinal poderia estar se cruzando. Esses pontos poderiam ser na entrada do discriminador ou no pré-amplificador.

Os passos do teste eram:

- Retirar o canal esquerdo da entrada do discriminador e fazer uma aquisição só com o canal direito;
- Retirar o canal direito da entrada do discriminador e fazer uma aquisição só com o canal esquerdo;
- Reconectar ambos os canais no discriminador;
- Retirar no pré-amplificador o canal esquerdo e fazer uma aquisição só com o lado direito;
- Retirar no pré-amplificador o canal direito e fazer uma aquisição só com o lado esquerdo;
- Reconectar os dois canais no pré-amplificador ;
- Retirar o fio de referência do lado esquerdo e fazer uma aquisição só com o lado direito,
- Retirar o fio de referência do lado direito e fazer uma aquisição só com o lado esquerdo.

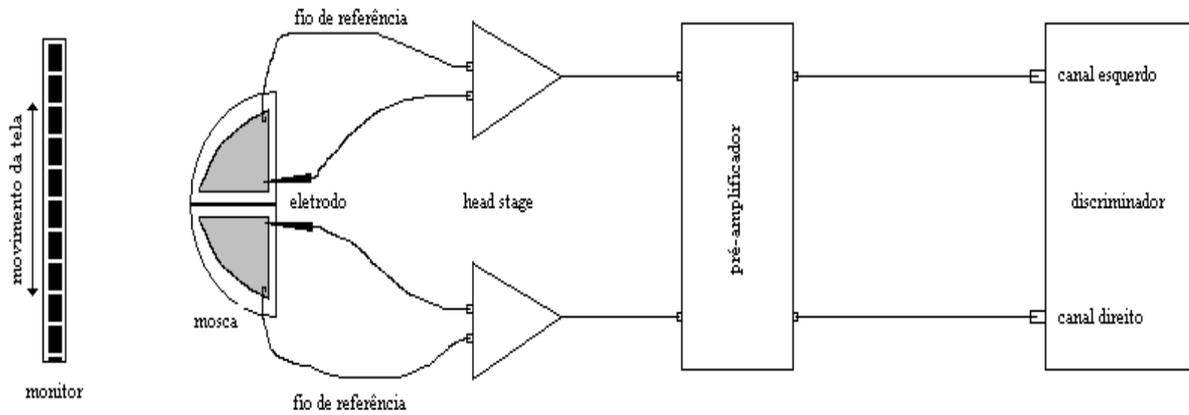


Figura 11: Esquema fora de escala para representar o sistema de aquisição como foi montado primeiramente. O teste da parte analógica do sistema de aquisição foi feito baseado nesse esquema. Esse esquema vale para a mosca virtual e a verdadeira.

Quando desconectávamos os fios de referência, o ruído do lado que estava sem o fio de referência aumentava, mas o sinal era facilmente discriminado pelo equipamento, uma vez que aterrássemos os Head Stage, pois o fio de referência serve para o "aterramento" da cabeça da mosca. O esquema do teste analógico pode ser visto na figura 11.

Ligado	Desligado	Esquerda			Direita		
		Spike	Intervalo < 2ms	%	Spike	Intervalo < 2ms	%
esq. e dir. (normal)		46101	4597	9,97	51448	113	0,22
discriminador dir.	discriminador esq.	X	X	X	35454	22	0,06
discriminador esq.	discriminador dir.	34433	424	1,23	X	X	X
pré-amplif. dir.	pré-amplif. esq.	X	X	X	53155	14102	26,53
pré-amplif. esq.	pré-amplif. dir.	37600	186	0,46	X	X	X
fio de ref. dir.	fio de ref. esq.	32400	3392	10,47	41119	766	1,86
fio de ref. esq.	fio de ref. dir.	60089	3161	5,76	10235	1208	11,80

Tabela 1: A tabela mostra quantidade de spikes com intervalos de tempo menores de 2ms com uma aquisição de 5 minutos. Os X indicam que não há valores nesses locais, pois estavam desligados.

A idéia era verificar se o sinal de um lado estava contaminando o outro, verificando assim o que chamamos de crosstalk. Infelizmente os spikes com intervalos menores de 2ms continuavam a existir, como pode ser visto na tabela 1, então a possibilidade do pré-amplificador estar com problema foi descartada, pois quando retirássemos o conector do pré-amplificador do lado direito não poderia ocorrer sinais cruzados do lado esquerdo e vice e versa, o que não ocorreu. O fato dos Head Stage serem separados um do outro

descartava a idéia do sinal estar cruzando nesse ponto. O que nos levou a crer que havia algo errado do discriminador até o computador.

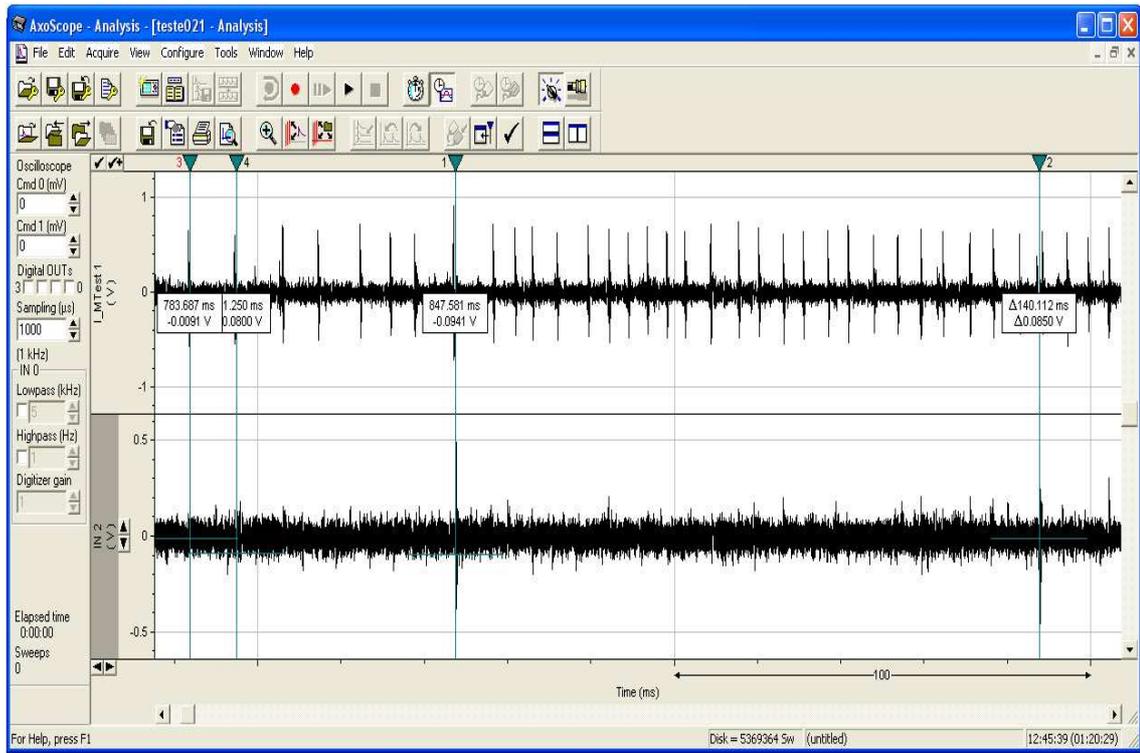


Figura 12: Tela do programa AxonScope responsável pela aquisição analógica do sinal dos H1. A tela de cima é o eletrodo esquerdo e a de baixo é o eletrodo direito. Nota-se a ausência de alguns spikes presentes na aquisição analógica.

Colocamos a placa Axon para auxiliar no monitoramento do experimento. Fizemos uma aquisição simultânea com o discriminador digital (nosso sistema de aquisição multi-canal) e da placa Axon (que faz uma aquisição analógica). Com a aquisição simultânea poderíamos verificar a ausência ou a presença dos spikes com intervalo de tempo menor de 2ms, desde que conseguíssemos identificar uma seqüência de spikes na aquisição digital e na analógica para comparar.

Quando comparamos ambas as aquisições vimos que os spikes com intervalo menor de 2ms existentes no sistema digital não existiam na aquisição do sistema analógico. Se os spikes estivessem passando de um canal para o outro veríamos na aquisição analógica spikes coincidentes em ambos os canais, o que não se verificou na região em que o sistema digital apresentou os spikes com intervalos de tempo menores de 2ms. Na aquisição analógica os spikes com menos de 2ms não existiam e na aquisição digital esses spikes continuavam a existir (comparar figura 12 com a tabela 2), o que indicava erro no discriminador ou no hardware dedicado.

Para identificar uma seqüência de spikes usamos o estímulo de onda quadrada, onde é fácil identificar o padrão de resposta de um dos H1. Na figura 12 vemos um momento em que o neurônio direito está disparando (eletrodo esquerdo) e o neurônio esquerdo está quase sem responder (eletrodo direito), o que era de se esperar devido a seus sentidos preferenciais. Uma vez identificado um dos spikes fazia-se a diferença entre esse que foi identificado e seus próximos, assim conseguíamos identificar uma seqüência de spikes. Ao verificarmos que os spikes com intervalo de tempo menor de 2ms não apareciam na aquisição analógica feita com o Axon, confirmamos mais uma vez que havia algo errado com o discriminador.

Abaixo temos um exemplo de aquisição no qual temos os spikes com intervalo menores de 2ms, presentes no discriminador digital (tabela 2) e o mesmo trecho da aquisição visto no Axon na figura 12. Observando a tela do AxonScope vemos a ausência dos spikes que estão pintados de cinza na tabela. Os valores da tabela estão em segundos. Os valores da aquisição analógica são menores devido ao fato de ocorrer um pequeno atraso de 254ms em relação ao início da aquisição digital.

Tempo dos spikes direito (segundos)			Tempo dos spikes direito (segundos)		
Digital	Analógico	Diferença	Digital	Analógico	Diferença
1,101032704	0,846339	0	1,038573056	0,783879352	0
1,241187584	0,98649388	0,140154880	1,03860992	0,783916216	3,686400E-05
1,289323264	1,03462956	0,188290560	1,050135296	0,795441592	0,011562240
1,297745408	1,043051704	0,196712704	1,050172928	0,795479224	0,011599872
1,393639424	1,13894572	0,292606720	1,0587008	0,804007096	0,020127744
1,429316608	1,174622904	0,328283904	1,05873792	0,804044216	0,020164864
1,451533824	1,19684012	0,350501120	1,068759552	0,814065848	0,030186496
1,459988224	1,20529452	0,358955520	1,068800256	0,814106552	0,030227200
1,470697728	1,216004024	0,369665024	1,076024832	0,821331128	0,037451776
1,606174464	1,35148076	0,505141760	1,076061696	0,821367992	0,037488640
1,733632768	1,478939064	0,632600064	1,081890816	0,827197112	0,043317760

Tabela 2: Do lado direito temos alguns exemplos de spikes com menos de 2ms de diferença. Os spikes em vermelho são os problemáticos. Nota-se que a diferença do posterior para o anterior é menor que 2ms.

Retiramos o discriminador para uma verificação e descobrimos que ele tinha um diodo em curto, o que estava influenciando no limiar de comparação de baixo nível do discriminador do canal esquerdo. Esse limiar é responsável pelo registro do spike, pois é ele que diz ao discriminador que ocorreu um spike. Mas isto não era a causa dos spikes com

intervalos de tempo menores de 2ms, pois o erro estava somente em um canal e os spikes apareciam em ambos os canais.

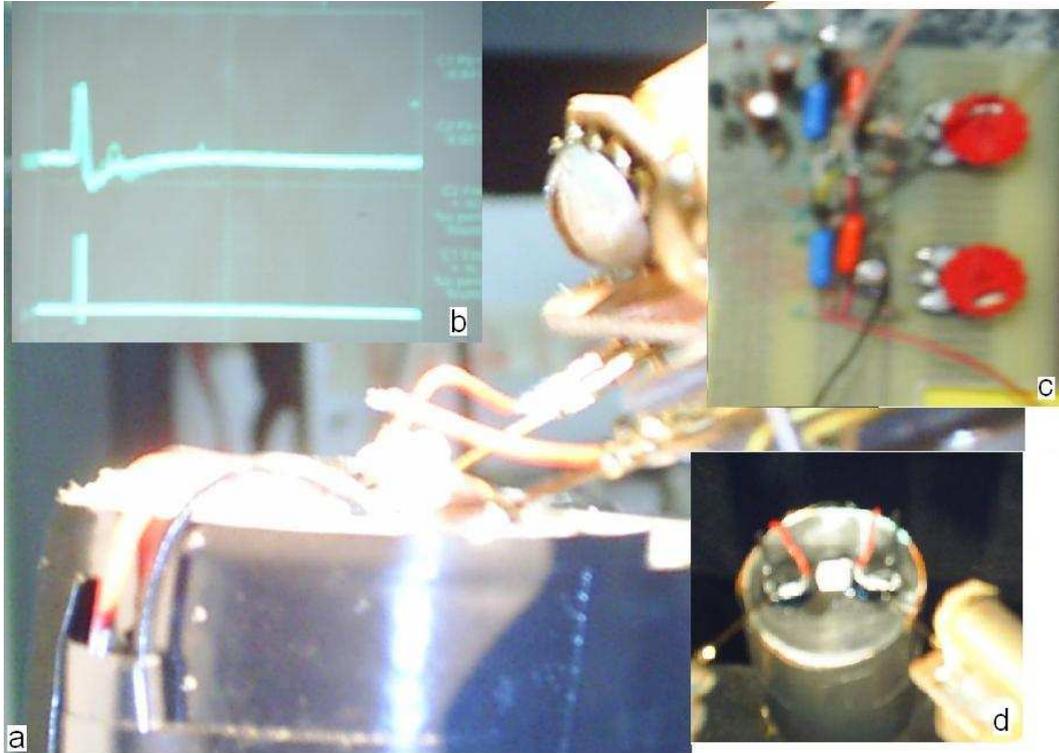


Figura 13: Mosca virtual. a - a mosca virtual vista lateral, b - o spike eletrônico, c - gerador de spikes eletrônicos, d - a mosca virtual vista de cima.

A suspeita continuava sobre o discriminador. Tentamos uma nova abordagem que foi simular (ingenuamente) a cabeça da mosca usando um pequeno recipiente (onde fizemos duas cavidades para representar os lados da cabeça da mosca com uma pequena comunicação entre os lados), e um gerador de spikes eletrônico. Preenchemos essas cavidades com ringer, que é um líquido que colocamos na cabeça da mosca quando esta começa a secar.

O gerador de spikes eletrônico tem uma frequência ajustável, então cada lado tem uma frequência diferente. Inserimos uma frequência constante, para analisarmos as taxas de disparo que teríamos de cada lado. Usamos o mesmo método descrito na figura 11 para ver se continuavam os spikes com intervalos de tempo menores de 2ms.

A idéia de usar uma mosca eletrônica era que, por sabermos a frequência que estávamos colocando, tornaria mais fácil enxergar o possível problema. Também para facilitar a aquisição, pois, muitas vezes, não conseguimos encontrar o sinal do H1 com relativa facilidade, o que atrasava os testes.

Simulamos o sinal do H1 atenuando o sinal saído do gerador de spikes cerca de 10000 vezes para termos um valor próximo à voltagem de disparo do H1. O spike gerado pelo gerador de spikes pode ser visto na figura 13.b; nós o construímos de forma a ser parecido com o spike da mosca.

A idéia era ver se o discriminador estava duplicando alguns spikes. O que não foi confirmado, pois nos raster vimos que as taxas estavam corretas, desde que o nosso gerador de spikes estivesse ligado direto no discriminador. Os spikes duplos não apareciam quando colocávamos o gerador de spikes direto no discriminador, eles só ocorriam quando injetávamos na mosca virtual indicando a presença de um ruído ou algo que estava se incorporando ao sinal que saía da cabeça da mosca virtual.

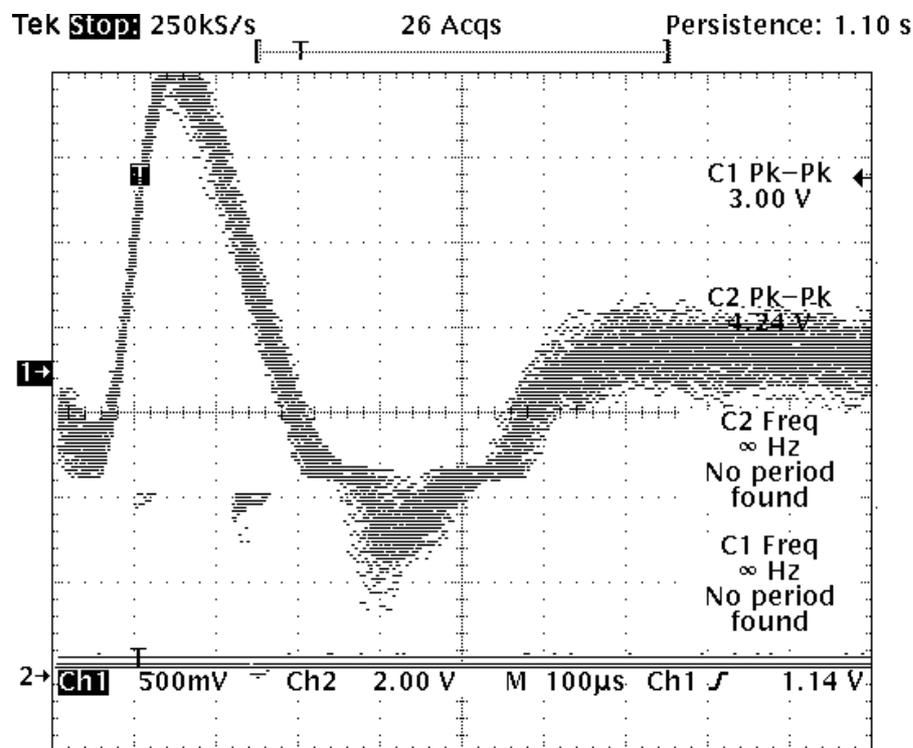


Figura 14: Mostra a presença de spikes duplos devido a alta freqüência associada os sinal do H1

Durante o processo com a "mosca virtual" foi observada uma componente de alta freqüência no sinal que estaria interferindo no discriminador, devido ao fato deste ser muito rápido. Esta alta freqüência que estava se associando ao sinal fazia com que ele identificasse alguns spikes como se ocorressem dois (ver figura 14). Essa era a origem dos spikes com intervalos menores de 2ms. O sinal estava muito instável, então foram feitos dois filtros passivos, um passa alta e outro passa baixa, para colocar antes do sinal entrar no discriminador. O filtro passa-alta cortava em 3Khz e o passa-baixa cortava em 4Khz

(ver figura 16).

Esses filtros permitiram uma aquisição mais limpa, ou seja, boa parte dos nossos spikes duplos (spikes com intervalos menores de 2ms) sumiu, indicando que teríamos de colocar filtros melhores. Os filtros atenuavam demais o sinal, de forma que foram substituídos por um filtro ativo do tipo Bessel de terceira ordem que permite a passagem de sinais com frequência entre 300Hz e 5Khz. Com a utilização desse novo filtro tivemos uma redução significativa dos spikes indesejados sem a atenuação dos filtros passivos. Faremos uma breve descrição dos filtros na seção posterior.

Na figura 15 mostramos a diferença do sinal com e sem os filtros. O que possivelmente estava acontecendo é que um ruído externo de alta frequência estava se incorporando ao sinal do H1, através do eletrodo, e como o discriminador tem resolução o suficiente para enxergar a variação do sinal, ele interpretava uma queda devido à alta frequência que se incorporava ao sinal como outro spike e assim, surgiam os spikes com intervalos menores de 2ms, e o discriminador enviava para o hardware dedicado 2 spikes ao invés de 1. Como podemos ver na figura 14 alguns spikes duplos aparecem devido a esse ruído de alta frequência.

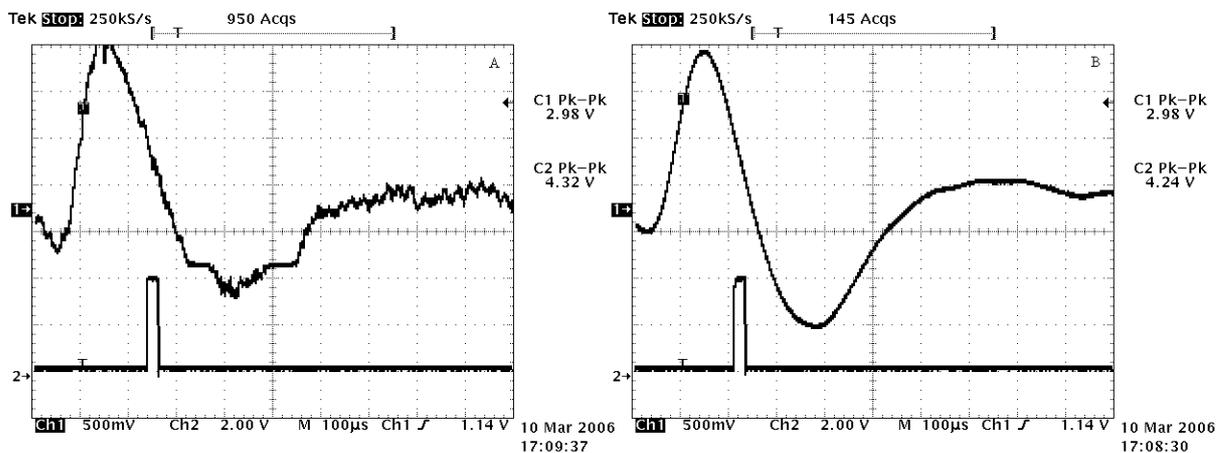


Figura 15: Comparação entre os spikes com e sem o filtro. O spike da esquerda está sem o filtro e o da direita está com o filtro

4.2 Filtros Lineares

Filtros são dispositivos que têm por finalidade eliminar sinais de uma determinada frequência ou de uma faixa de frequências acima ou abaixo de um valor limite. Pode ser passivo, quando emprega apenas componentes passivos (resistores, capacitores e indu-

tores), ou ativo, quando emprega componentes ativos (transistores, circuitos integrados, etc.)

Um filtro linear aplica um operador linear a um sinal de entrada que varia com o tempo. Os filtros lineares são muito comuns na eletrônica e no processamento de sinais digitais. Eles são comumente utilizados para eliminar as frequências não desejadas de um sinal de entrada ou para selecionar uma frequência de um sinal. Independentemente se eles são eletrônicos, elétricos ou mecânicos, ou em quais faixas de frequência trabalhem, a teoria matemática dos filtros lineares é a mesma.

Existem vários tipos de filtros lineares, entre eles:

- Um filtro passa-baixa: que permite a passagem de frequências abaixo de sua frequência de corte.
- Um filtro passa-alta: que permite a passagem de frequências acima de sua frequência de corte.
- Um filtro passa-faixa: que permite a passagem apenas de uma faixa de frequências.
- Um filtro rejeita-faixa: que permite a passagem de todas as frequências fora de uma certa faixa.
- Um filtro passa-tudo: que permite a passagem de todas as frequências, porém altera a relação de fase entre elas.

Dos filtros acima relacionados, o que nos interessam são os passa-alta, passa-baixa e passa-faixa. Os filtros passa-faixa podem ser construídos a partir de combinações entre os filtros passa-baixa e passa-alta.

4.2.1 Filtro Passivo Passa-Alta

Um filtro passivo passa-alta (figura 16.b) é um filtro que permite a passagem das frequências altas com facilidade, porém atenua (ou reduz) a amplitude das frequências abaixo da frequência de corte. A quantidade de atenuação para cada frequência e a frequência de corte varia de filtro para filtro.

Ele é muito utilizado para bloquear as frequências baixas não desejadas em um sinal complexo enquanto permite a passagem das frequências mais altas. As frequências são

consideradas "altas" ou "baixas" quando estão acima ou abaixo da frequência de corte, respectivamente.

O filtro passivo passa-alta mais simples existente consiste de um capacitor em série com um resistor. O valor da resistência vezes o valor da capacitância ($R * C$) é a constante de tempo; ela é inversamente proporcional à frequência de corte, e o valor da amplitude de saída do sinal é igual a metade do valor da amplitude de entrada:

$$f = \frac{1}{2\pi RC} \quad (4.1)$$

Onde: f é a frequência, dada em hertz, R é o valor de Resistência, dado em omhs e C é o valor da capacitância, dado em farads.

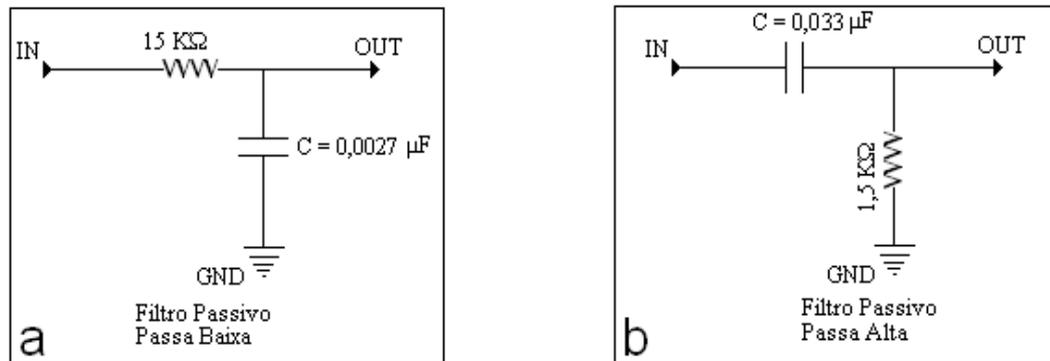


Figura 16: Filtros passivos. a - Filtro passivo passa-baixa com frequência de corte de(4khz), b - o filtro passivo passa-alta te frequência de corte 3Khz

4.2.2 Filtro Passivo Passa-Baixa

O filtro passivo passa-baixa (figura 16.a) é o nome comum dado a um circuito eletrônico que permite a passagem de baixas frequências sem dificuldades e atenua (ou reduz) a amplitude das frequências maiores que a frequência de corte. A quantidade de atenuação para cada frequência varia de filtro para filtro.

Um circuito eletrônico simples que funciona como um filtro passa-baixa consiste de um resistor em série com um capacitor. O capacitor exibe reatância, e bloqueia os sinais de baixa frequência, fazendo com que eles passem pela carga. A frequência mais alta reduz a reatância e o capacitor conduz com facilidade as altas frequências. A frequência de corte é determinada da mesma forma que o do filtro passa-alta (formula 4.1).

Um modo de compreender estes circuitos (passa-alta e passa-baixa) é voltar-se ao

tempo que o capacitor leva para se carregar. O capacitor leva um período de tempo para carregar e descarregar através do resistor:

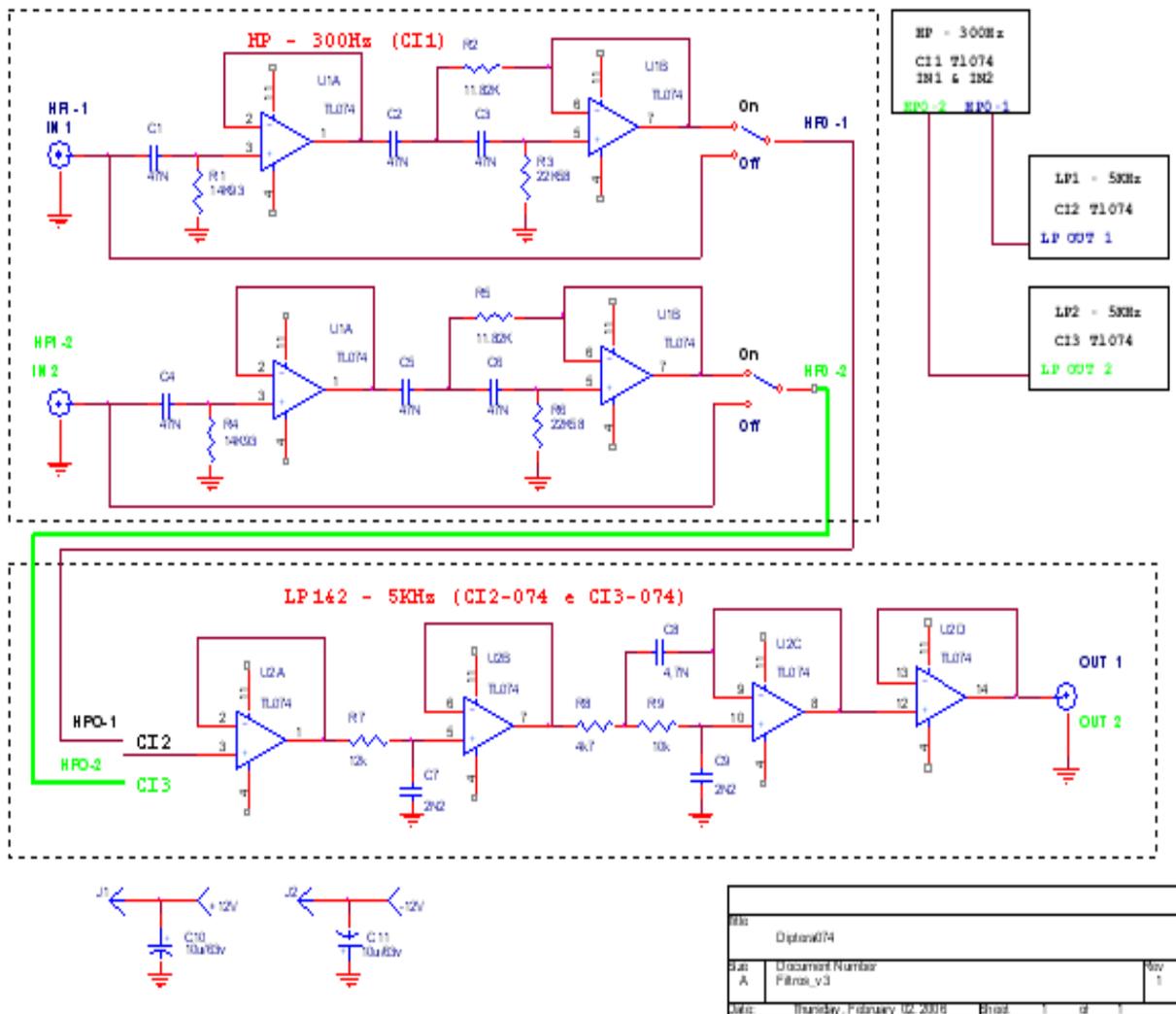


Figura 17: Filtro ativo tipo Bessel terceira ordem com corte entre 300Hz e 5KHz

- As baixas frequências exigem um tempo longo para que o capacitor se carregue até atingir praticamente a mesma voltagem que a tensão de entrada. As altas frequências o capacitor tem tempo apenas para uma pequenas carga antes que as entradas invertam sua polaridade.
- A saída sobe e desce apenas uma pequena quantia de tempo com relação às subidas e descidas da entrada. A uma frequência dobrada, existe tempo apenas para que o capacitor se carregue metade do que poderia se carregar antes.

4.2.3 Filtro Ativo

Um filtro ativo (figura 17) é um tipo de filtro eletrônico analógico, que se distingue dos outros pelo uso de um ou mais componentes ativos, que podem prover alguma forma de amplificação da potência. Tipicamente estes componentes podem ser uma válvula termiônica, um transistor ou um amplificador operacional.

Em eletrônica e processamento de sinais, um filtro tipo Bessel é uma variedade de filtro linear com uma resposta de fase o mais plana possível. Os filtros Bessel são comumente utilizados em sistemas de crossover de áudio.

A escolha pelo filtro ativo tipo Bessel foi devido à sua relação ótima quando se trata de sinais com transientes, uma forma de ver o sinal do spike.

5 Resultados

5.1 Resultados dos Testes

Apresentaremos a seguir alguns rasters e as taxas de disparo de alguns estímulos. Os estímulos usados são de 20 segundos, então cada linha do raster é uma apresentação do estímulo à mosca. No caso dos rasters apresentados aqui todos foram feitos com o estímulo descorrelacionado com média zero; sendo que no estímulo apresentado na figura 9, notamos certa inversão na parte repetida (0 a 10 segundos) que é o que esperávamos ver. Outra coisa a dizer é que nos gráficos abaixo, as repetições no caso estão se referindo ao eletrodo e não ao neurônio registrado.

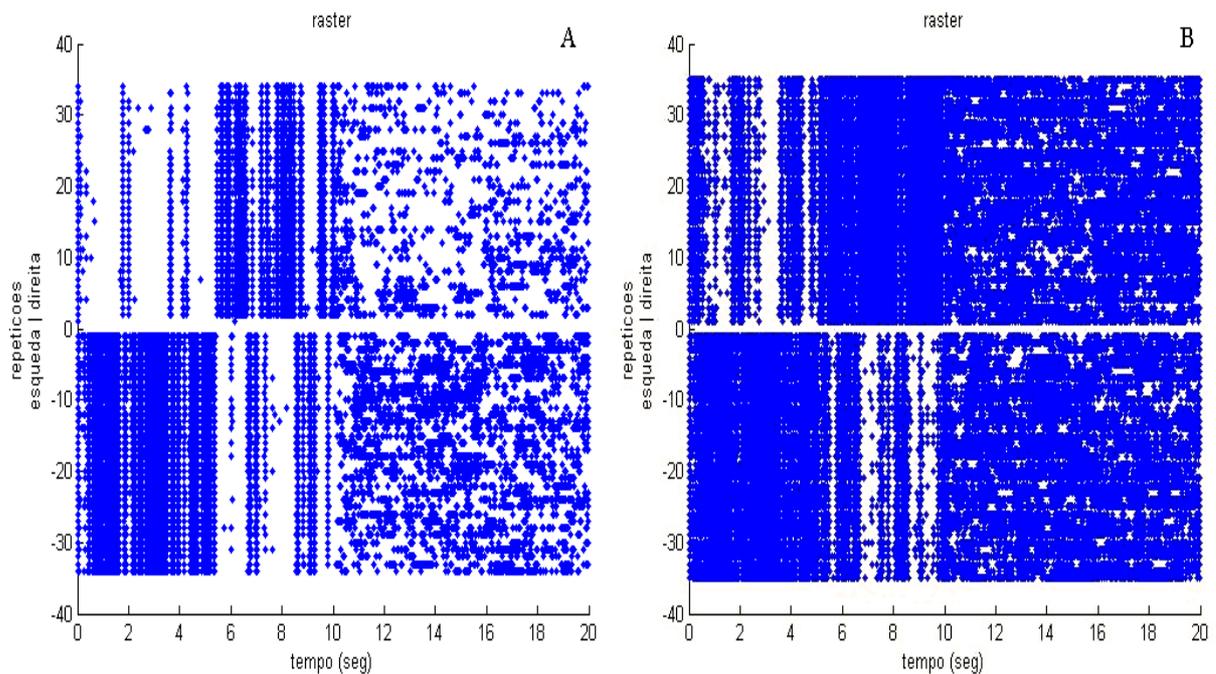


Figura 18: O raster de duas aquisições com o mesmo estímulo. As repetições dos lados direito e esquerdo são em relação ao eletrodo - A: raster de uma aquisição que tem muitos spikes duplos e com uma taxa de disparo ruim para uma aquisição de 11 minutos. B: raster de uma aquisição no qual tivemos uma pequena quantidade de spikes duplos.

No começo dos testes, quando ainda não estávamos com os filtros, fizemos algumas aquisições para testar o equipamento; por exemplo, na figura 18.A do lado esquerdo havia 25989 spikes, desses 1510 tinham intervalos de tempo menor que 2ms, cerca de 6% dos spikes eram suspeitos. Do lado direito havia 8514 spikes, desses, 965 tinham intervalos de tempo menor que 2ms; cerca de 11% dos spikes eram suspeitos. A taxa de disparo do lado esquerdo é de 35 spk/seg e do lado direito é 11 spk/seg. O estímulo foi apresentado à mosca mais ou menos 35 vezes, o que dá um tempo total de aproximadamente 11 minutos de aquisição. O problema da taxa de disparo diferente, neste caso, pode ter sido devido à falta de calibração no início da aquisição. Reparamos que, apesar de termos muitos spikes com intervalos menores de 2ms, notamos que as estruturas de resposta de cada H1 é mantida.

Depois de colocado o filtro ativo tivemos uma redução significativa dos spikes duplos, por exemplo: em uma das últimas aquisições, do lado esquerdo havia 96054 spikes. Desses, 13 tinham intervalos menores que 2ms, cerca de 0,013% dos spikes eram suspeitos. Do lado direito havia 128385 spikes, 04 tinham intervalos de tempo menor que 2ms, cerca de 0,003% dos spikes eram suspeitos, com taxas de disparo esquerdo de 44 spk/seg e direito de 59 spk/seg (ver figura 18.B). Esta aquisição tem 40 minutos.

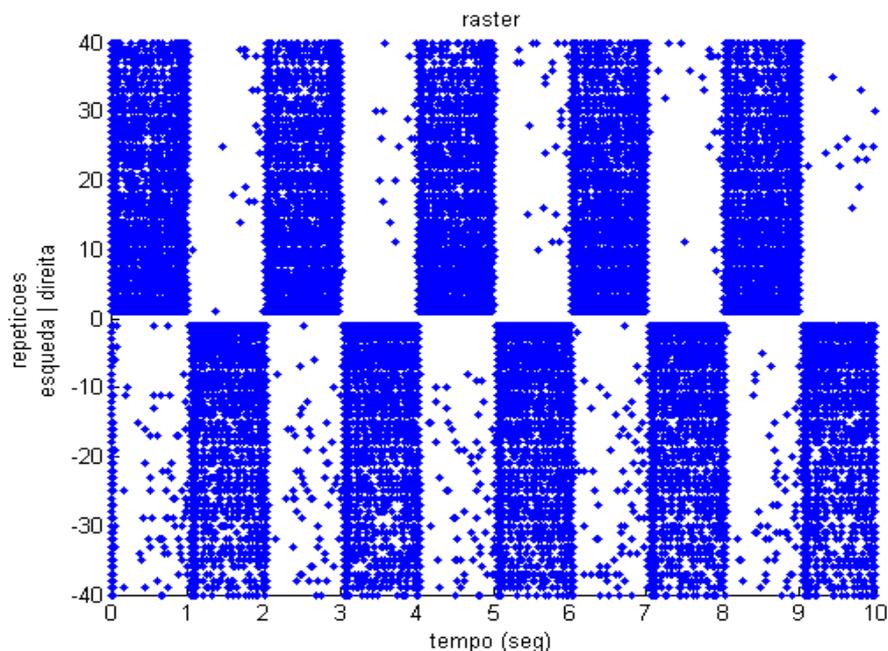


Figura 19: Raster de um estímulo de onda quadrada no qual tivemos taxa de disparo esquerda 20 spk/seg e taxa de disparo direita 28spk/seg

Depois de usar os filtros passivos, chegamos à conclusão de que seria necessário o uso

de um filtro ativo, pois, os passivos atenuavam demais o sinal do H1. Por isso, a escolha do filtro ativo tipo Bessel de terceira ordem; pois ele não atenuava o sinal e retirava as frequências indesejáveis, que estavam se incorporando a ele, além de ser o melhor quando usado para o caso de sinais com transientes.

Então foi necessário incorporar no sistema de aquisição, um pacote de filtros de ordem maior, para eliminarmos possíveis componentes de frequências altas que nos permeiam, pois o sistema é muito sensível a interferências, como podemos notar na figura 15.

5.2 Raster

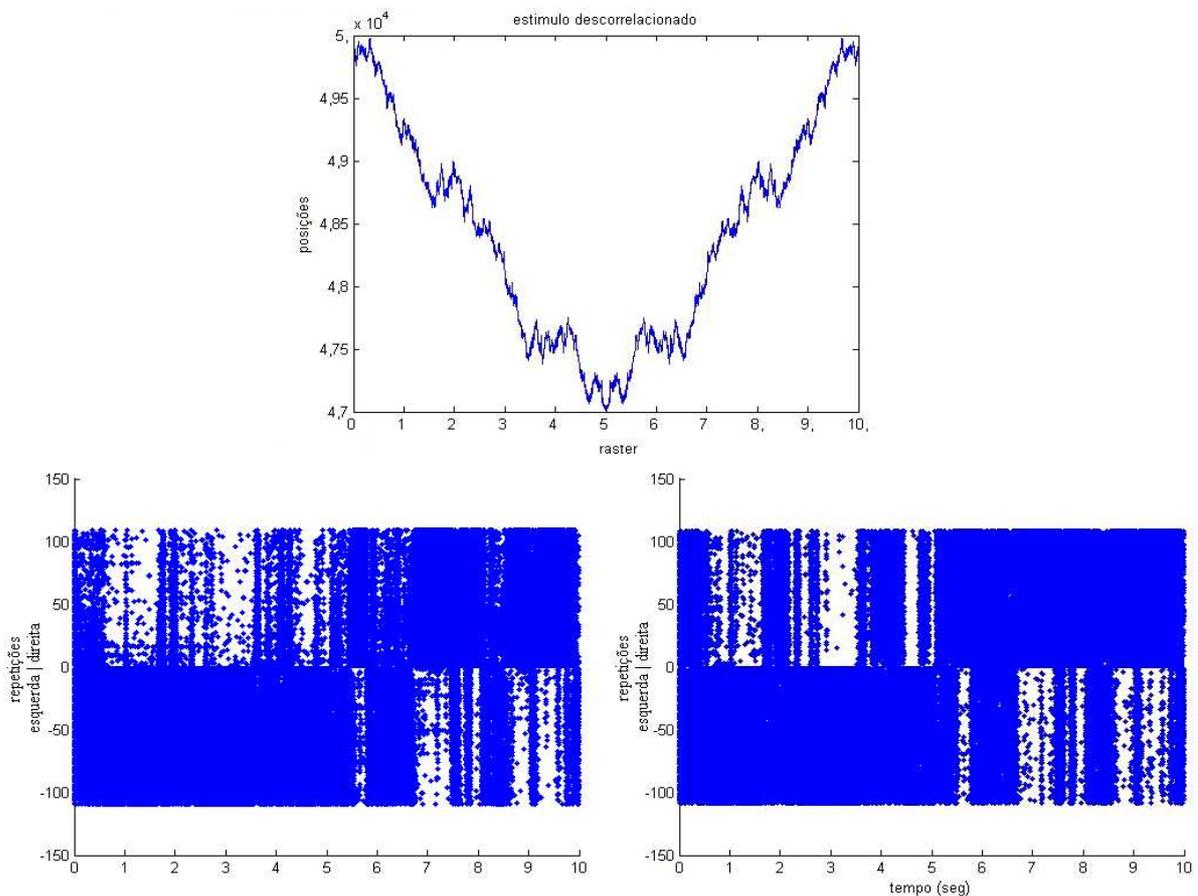


Figura 20: A figura mostra o estímulo e dois rasters feitos com moscas diferentes, mostrando a reprodutibilidade.

Uma vez que conseguimos fazer aquisições de forma a ter poucos spikes duplos fizemos uma série com tempos de correlação diferentes. Nesse raster é possível verificar a direção e sentido preferencial do H1 devido às estruturas apresentadas nos rasters. Podemos notar que quando o H1 esquerdo está respondendo, o direito está parado e vice e versa. O H1

libera pulsos espontâneos independente do estímulo ao qual é apresentado, por isso vemos alguns spikes durante o momento em que ele não deveria estar disparando.

O melhor raster para ver o sentido preferencial de cada H1 é aquele com o estímulo de onda quadrada, no qual excitamos um H1 de cada vez(ver figura 19).

Na figura 20 vemos os raster de estímulos iguais; no caso é o estímulo descorrelacionado com média zero. Podemos notar que apesar de serem moscas diferentes, eles são parecidos mostrando a reprodutibilidade da experiência.

5.3 Taxas de Disparo

Apresentamos abaixo várias taxas de disparo para os H1 esquerdo e direito, de três moscas diferentes, com estímulos e tempos de correlação diferentes. Os tempos de correlação estão em bin, cada bin tem 2ms. Nota-se que não temos um padrão, na mosca 1 o H1 esquerdo dispara mais e nas moscas 2 e 3 é o H1 direito que dispara mais. Esta é a dificuldade na realização de experimentos, pois não temos controle sobre isso.

Estímulo	Mosca 1		Mosca 2		Mosca 3	
	Direita (spk/seg)	Esquerda (spk/seg)	Direita (spk/seg)	Esquerda (spk/seg)	Direita (spk/seg)	Esquerda (spk/seg)
Calibração	54	56	28	20	41	31
Tempo de correlação = 0	62	68	58	55	59	44
Tempo de correlação = 2	63	68	64	62	78	50
Tempo de correlação = 4	69	76	65	59	70	53
Tempo de correlação = 6	49	51	75	87	75	48
Tempo de correlação = 8	66	65	80	82	101	78

Tabela 3: A tabela mostra a taxa de disparo de cada H1 para moscas diferentes

Esperava-se este resultado, pois os H1's não devem ser simétricos. Notamos isso enquanto achamos o sinal, a maioria das vezes um dos H1 responde mais que o outro. Mesmo fazendo a calibração com o estímulo de onda quadrada as taxas são diferentes. Durante a calibração sempre há uma diferença entre a quantidade de spikes que são contados para cada lado.

Na figura 21 observamos as taxas de disparo para diversos estímulos com moscas diferentes e notamos que não há relação entre elas.

Um problema freqüente são moscas que têm um H1 que responde muito mais que o outro, atrapalhando bastante a aquisição, é o caso da figura 10, ou seja, parece que o H1 não está percebendo o estímulo à sua frente.

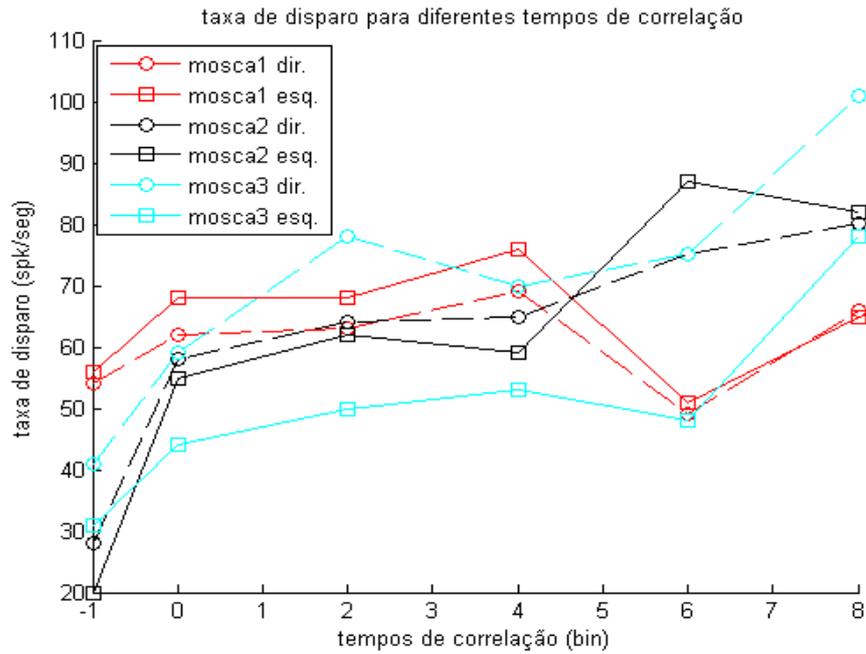


Figura 21: Taxa de disparo para diferentes tempos de correlação junto com a calibração. O valor -1 no eixo X é o valor da taxa de disparo para a calibração

6 *Conclusões*

Durante os testes do sistema de aquisição multicanal surgiram várias situações que precisavam ser contornadas. Algumas foram cruciais e sua resolução de suma importância para a validação do sistema.

Podemos afirmar que conseguimos contornar alguns dos problemas de forma satisfatória, principalmente os relacionados à eletrônica do sistema de aquisição. Os problemas relacionados à forma biológica infelizmente não temos como contorná-los, de forma que estamos amarrados à situação apresentada a cada mosca que montamos para a aquisição.

Os problemas biológicos presentes no experimento, percebidos durante os testes do sistema de aquisição foram: o fato de a mosca morrer mais rápido quando os dois lados da cabeça estão abertos, quando comparado com a forma anterior de montagem, que só se abria um lado. Mesmo a mosca estando alimentada e com ringer na sua cabeça ela não tem sobrevivido o suficiente, o que acarreta em menos tempo para as aquisições. Outro problema também relacionado a essa parte biológica está na procura dos sinais de cada H1, pois é necessária uma localização bastante precisa para eles.

Como temos o registro dos dois H1's é inevitável a comparação entre as taxas de disparo apresentadas por cada neurônio, assim aparece o fato de termos H1's que respondem muito mais que o outro quando olhamos para suas taxas de disparo. Não temos como contornar esse tipo de situação sem trocarmos a mosca. Outra coisa é pensarmos num modo melhor de calibração para termos uma taxa de disparo aproximadamente igual para ambos os lados.

Dos problemas eletrônicos apresentados conseguimos contornar todos. Os mais relevantes foram: o monitoramento dos canais do discriminador e os spikes com intervalos de tempo menores de 2ms (spikes duplos). O problema do monitoramento dos canais do discriminador foi relativamente fácil de ser resolvido com o acréscimo de um chaveador e com a placa Axon, sendo que os spikes duplos demandaram um pouco de pesquisa e paciência como relatamos.

O problema dos spikes com intervalos de tempo menores de 2ms necessitava de uma solução para validar o sistema de aquisição. Este, foi resolvido quando acrescentamos um filtro ativo do tipo Bessel de terceira ordem, o qual eliminava o ruído que fazia surgir os spikes duplos. Ele eliminava frequências abaixo de 300Hz e acima de 5kHz que se incorporavam ao sinal do H1 no eletrodo, assim passando por toda a parte analógica, permitindo que o discriminador enxergasse alguns spikes como se fossem dois, fazendo aparecer os spikes que tinham um intervalo de tempo menores de 2ms.

Esse ruído de alta frequência que se incorpora ao sinal pode ser eliminado com o filtro que colocamos ou usando uma gaiola de Faraday. Não sabemos sua origem ao certo, mas deve ser proveniente de computadores ligados na região do laboratório, rede elétrica, redes wireless, colocadas próximas, assim contaminando nosso sistema.

Para o futuro temos algumas pretensões em relação ao sistema atual, quanto à análise de dados e ajustes no sistema de aquisição. Em nível de ajustes queremos aperfeiçoar o uso da placa Axon, tanto em monitoramento quanto para aquisições extracelulares. Podemos dizer que o monitoramento melhoraria bastante, pois poderíamos ver os seis canais ao mesmo tempo no computador. Coisa que hoje não é possível.

Queremos colocar também um pacote de filtros mais robusto. Do tipo Bessel de sexta ordem para termos uma suavização melhor do sinal e assim eliminarmos o problema do ruído de alta frequência que nos permeia.

Também pretendemos utilizar dois monitores no estudo das interações entre os H1's, simulando a rotação e a translação de forma mais eficiente, para podermos apresentar estímulos diferentes para cada olho.

Uma outra possibilidade é o uso da teoria da Informação de Shannon para estudar a transmissão da informação de um e dos dois H1's e compararmos o quanto de informação extra é transmitida quando temos os dois H1's.

Além disso, queremos também calcular os filtros lineares de primeira e segunda ordem para a reconstrução dos estímulos, comparando-a quando feita com um só H1 e usando os dois H1, para vermos se ela melhora.

Referências

- [1] Borror, J.B., DeLong, D.W. Introdução ao estudo dos insetos. São Paulo: *Edgar Blücher*, [1988].
- [2] A. Borst. Noise, not stimulus entropy, determines neural information rate. *Journal of Computational Neuroscience*, **14**, **419-437**, [2003].
- [3] A. Borst, J. Haag. Neural networks in the cockpit of the fly. *Journal of Comparative Physiology A*, 188(6), **419-437**, [2002].
- [4] A. D. Briscoe, L. Chittka. The evolution of color vision in insects. *Annual Review of Entomology*, **46**, **471-510**, [2001].
- [5] M.H. Dickinson, F. O. Lehmann, S. P. Sane. Wing rotation and the aerodynamic basis of insect fly. *Science*, bf 284, 1954-1960, [1999].
- [6] J. K. Douglass, N. J. Strausfeld. Retinotopic pathways providing notion selective information to the lobula from peripheral elementary motion-detecting circuits. *The Journal of Comparative Neurology*, **457**, **326-344**, [2003].
- [7] K. Hausen. Monokulare and Binoculare Bewegungsaswertung in der Lobula Plate der Fliege. *Verh. Dtsch. Zool. Ges.*, **49-70**, [1981].
- [8] K. Hausen. The lobula-complex of the fly: Structure, function and significance in visual behaviour. In M.A. All. *Photoreception and vision in invertebrates*, [1984].
- [9] M. F. Land, T. S. Collet. Chasing behaviour of houseflies (*Fannia canicularis*). *Journal of Comparative Physiology*, **89**, **331-357**, [1974].
- [10] S.B. Lughlin. Coding Efficiency and Design in Visual Processing. *Facets of Vision*, [1989].
- [11] Mc Alpine. J.F. (ed.) Manual of Neartic Diptera. vol. 1, 2 e 3. , Canadá , *Research Branch Agriculture*, [1989].
- [12] F. Rieke. Physical principles underlying sensory processing and computation. *NEC Research Institute*, Tese de doutorado, **229p**, [1991].
- [13] Pinto, Bruna Dayana Lemos. Translação e Rotação: processamento de informação no sistema visual da mosca, *Instituto de Física de São Carlos, USP*, Dissertação (Mestrado), [2005].
- [14] K. Vogt. Is the Fly Visual Pigment a Rhodopsin?. *Z. Naturf*, **38c**, **329-333**, [1983].
- [15] K. Vogt, K. Kirschfeld. The chemical identity of the cromophores of fly visual pigment. *Naturwissenschaften*, **71**, **211-213**, [1984].

ANEXO A - Classe dos Insetos ⇒ Ordem Diptera

Os insetos perfazem mais de 800 mil espécies catalogadas (fato que justifica uma ciência para estudá-los: a Entomologia). Destas, aproximadamente 120 mil são moscas. Dos animais terrestres, os insetos são os mais abundantes, mais bem sucedidos e mais diversamente distribuídos.

São os mais importantes invertebrados pois podem viver em locais secos, e são os únicos capazes de voar. A capacidade de voar permite-lhes escapar dos inimigos, capturarem presas e encontrar parceiros para a reprodução.

O seu tamanho varia desde menores que o maior protozoário (0,25 mm ou menores) até maiores que o menor vertebrado (besouros com 26 cm de comprimento ou libélulas com 28 cm de envergadura de asa).

São abundantes em todo o habitat, exceto no mar. Ainda que a maioria seja terrestre ou aérea, várias espécies vivem em água salobra ou doce, solo, plantas e dentro ou sobre animais, embora raramente matem os seus hospedeiros.

Não há certeza do motivo para o tremendo sucesso evolutivo destes animais, mas, das suas características principais, sem dúvida, a capacidade de voar acabou possibilitando essa dispersão máxima. Outro aspecto importante é o fato de serem animais pequenos, o que permite ocupar micro-habitat, inacessíveis a outros animais.

Os insetos apresentam ciclo de vida curto, por isso podem se multiplicar rapidamente em condições favoráveis. Na figura 22 temos um exemplo de coleópteros (besouros ou escaravelhos). Um único casal de coleópteros pode produzir, em apenas 432 dias, descendência suficiente para ocupar a totalidade do volume da Terra! Assim, as espécies predadoras são muito importantes para controlar o número de insetos.

Da classe dos insetos, estamos interessados na ordem das dípteras, mais especificamente nas moscas *Crhysomia Megacephala* (mosca varejeira), isso devido aos exaustivos



Figura 22: Exemplo de um coleópetro espécie *Streptocerus speciosus*

estudos nas últimas décadas, tanto no aspecto neurofisiológico [7, 3], como no aerodinâmico [5] que nos deu um certo conhecimento sobre suas propriedades.

Os Dípteros constituem uma das maiores ordens de insetos e seus representantes abundam em indivíduos e espécies em quase todos os lugares. A maioria dos Dípteros distingue-se prontamente dos outros insetos alados por possuir somente um par de asas, correspondente ao par anterior, transformando-se o par posterior em pequenas estruturas clavadas denominadas halteres, que funcionam como órgãos de equilíbrio [1].

A ordem Díptera pode ser dividida em duas sub-ordens [11]: Nematocera e Brachycera.

A sub-ordem Nematocera engloba os dípteros que possuem antenas com mais de seis segmentos livremente articulados, como os mosquitos (Culicidae), borrachudos (Simuliidae) e flebotomíneos (Psychodidae). A sub-ordem Brachycera reúne aqueles dípteros que possuem antenas com três a cinco segmentos, sendo que o último pode ser anelado ou portar uma arista.

Dentro de Brachycera e da infraordem Muscomorpha (Antiga sub-ordem Cyclorapha), estão as famílias alvos deste trabalho. Os dípteros desta infraordem são conhecidos como dípteros superiores ou dípteros muscóides.

As moscas da família Calliphoridae e Sarcophagidae, do gênero *Chrysomya* têm origem nas regiões tropicais e subtropicais do Velho Mundo, e foram introduzidas no Brasil por volta do ano de 1976. Três espécies são encontradas hoje na América do Sul: *C. albiceps*, *C. chloropyga*, *C. megacephala*. Estas moscas possuem um alto grau de sinantropia e são vetores de doenças por via mecânica. Devido a sua alta capacidade reprodutiva e agressividade das sua larvas, elas deslocaram as espécies nativas e hoje são as mais

abundantes em algumas regiões do país, inclusive em Belo Horizonte. Suas larvas criam-se em fezes e matéria orgânica em decomposição.

Com o conhecimento adquirido nos últimos anos e a facilidade de realizar aquisições eletrofisiológicas, a mosca tornou-se um excelente modelo para o estudo de sistemas neurais complexos.