UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

RENATA DA FONSECA MORAES BATISTA

Desenvolvimento de estímulos dinâmicos térmicos para análise do
sistema sensorial infravermelho em serpentes

São Carlos
2013

RENATA DA FONSECA MORAES BATISTA

Desenvolvimento de estímulos dinâmicos térmicos para análise do
sistema sensorial infravermelho em serpentes

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Física do Instituto de
Física de São Carlos da Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular

Orientador: Prof. Dr. Jan Frans Willem
Slaets.

Versão Corrigida
(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos
2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Batista, Renata da Fonseca Moraes

Desenvolvimento de estímulos dinâmicos térmicos
para análise do sistema sensorial infravermelho em
serpentes / Renata da Fonseca Moraes Batista;
orientador Jan Frans Willem Slaets - versão
corrigida -- São Carlos, 2013.

92 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em
Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física
de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2013.

1. Cascavel. 2. Radiação infravermelha. 3. Fosseta
loreal. 4. Estímulo dinâmico. 5. Teto óptico. I. Frans
Willem Slaets, Jan , orient. II. Título.

Aos meus pais e familiares, que com muito amor e carinho me apoiaram ao longo do período de elaboração deste trabalho, e aos meus amigos que tanto me ajudaram para que este trabalho fosse concluído.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais que tanto me ajudaram nas horas difíceis, torceram e fizeram de tudo para que eu chegasse até aqui. Ao carinho e apoio fornecido por eles e aos ensinamentos que me tornaram a pessoa que sou hoje.

Agradeço especialmente ao Prof. Dr. Jan Slaets que me capacitou e me deu a oportunidade de concretizar este trabalho e ao Prof. Dr. Reynaldo Pinto que tanto me ensinou e ajudou para que este trabalho acontecesse.

Agradeço também a vários outros professores, entre eles Prof Dr. Pedro Carelli, Prof. Dr. Denis O. V. Andrade, que além de nos proporcionar conhecimento nos ajudou nessa longa caminhada, sempre apoiando e ajudando quando preciso. Agradeço também ao Guilherme Gomes pela ajuda, conversas e lanchinhos! Muito obrigada.

Aos meus amigos que me apoiaram e torceram por mim ao longo dos anos da faculdade e pós graduação, que me ouviram, me ajudaram, me explicaram e me proporcionaram anos muito felizes. Em especial à Carolina, Jéssica, Matias, Tuma, Thiago, Caface, Felipe e Cristiane pela amizade conquistada, pelas broncas, pelas brincadeiras e pelo aprendizado na convivência que tivemos.

Agradeço muito à Andreza pela amizade, conversas, desabafos e conselhos dados ao longo desses anos. Muito obrigada! Agradeço também ao Nelson pelo carinho, companheirismo, pelas conversas, conselhos, compreensão e apoio!

Agradeço ao Lírío e ao técnico Ailton, que ajudaram a desenvolver os dispositivos eletrônicos, e também aos técnicos Ivanilda e Marquinho pela amizade conquistada e pelas risadas ao longo da pós graduação. Agradeço ao pessoal da oficina mecânica que me ajudou no procedimento dos equipamentos, em especial ao Pereira que tanto me “quebrou galhos” de última hora!

À USP por me dar a oportunidade de estudar, pesquisar e crescer profissionalmente e pessoalmente.

À CAPES pelo suporte financeiro neste trabalho.

MUITO OBRIGADA PESSOAL!

“Quando examino a mim mesmo e aos meus métodos de pensar, chego à conclusão que o dom da fantasia significa muito mais para mim que qualquer outro talento para pensar positiva e abstratamente.”
(Albert Einstein)

“Os bons vão ao passo certo; os outros ignorando-os inteiramente, dançam à volta deles a coreografia da hora que passa.”
(Franz Kafka)

RESUMO

BATISTA, R. F.M. Desenvolvimento de estímulos dinâmicos térmicos para análise do sistema sensorial infravermelho em serpentes. 2013. 92 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

Criar um ambiente experimental capaz de medir a resposta neural da visão (térmica) – em serpentes - quando estimulada por radiação infravermelha. Tratou-se da criação de estímulos dinâmicos artificiais dos quais a temperatura e a velocidade de deslocamento foram controlados. A resposta da cobra, quanto a esses estímulos, foi captada diretamente do cérebro da mesma (teto óptico), que corresponde aos processos visuais e infravermelhos do sistema nervoso central da cascavel. Mostramos que com esses estímulos criados, foi possível obter dados experimentais capazes de viabilizar análises de sensibilidade do sistema sensorial infravermelho em relação a contraste em temperatura e velocidade de movimento de presas artificiais.

Palavras-chave: Cascavel. Radiação infravermelha. Fosseta loreal. Estímulo dinâmicos. Teto óptico.

ABSTRACT

BATISTA, R. F. M. Development of dynamic thermal stimuli for analysis of the infrared sensory system in snakes. 2013. 92 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

The present work describe a creation of an experimental environment capable of measuring the neural response of vision (thermal) –in snakes -when stimulated by infrared radiation. There will be a creation of artificial dynamic stimuli of which the temperature and displacement velocity can be controlled. The response of the snake, when presented to these stimuli, captured directly from the brain (tecto optic), which corresponds to visual and infrared process in the central nervous system of the rattlesnake. We showed that with these stimuli created, it is possible to obtain experimental data which will allow analysis of sensitivity of the infrared sensory system in relation to contrast in temperature and speed of movement of false prey.

Keywords: Rattlesnake. Infrared radiation. Pit organ. Dynamic stimuli. Tecto optic.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 RADIAÇÃO INFRATERMELHA (IR) E CORPO NEGRO	19
2.1 Radiação Infratermelha (IR)	19
2.2 Radiação Infratermelha no Reino Animal	21
2.3 Cobras e a Radiação infratermelha nas cobras	22
3 CASCAVÉIS	25
4 MORFOLOGIA, INERVAÇÃO E A VIA SENSORIAL DA PERCEPÇÃO INFRATERMELHA NA FOSSETA	27
4.1 Processamento da informação infratermelha e a Formação da imagem na fosseta loreal	32
4.2 O “papel” do background na percepção da radiação infratermelha	36
5 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	41
6 METODOLOGIA	45
6.1 Procedimento Cirúrgico	45
6.2 Montagem dos estímulos e background	48
6.2.1 Background	48
6.2.2 Estímulos	52
6.3 Dispositivo para controle de velocidades e ciclos dos estímulos	55
7 SET-UP E ANÁLISE DOS DADOS	59
8 RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
9 CONCLUSÃO	87
REFERÊNCIAS	89

1 INTRODUÇÃO

Muito se especula sobre o funcionamento do sistema sensorial infravermelho das serpentes, como os termosensores atuam e como a informação é repassada para o cérebro.

Algumas cobras peçonhentas, além de algumas outras cobras e animais, desenvolveram órgãos especiais de recepção de calor que os ajudam a perceber animais de sangue quente. Esse órgão –chamado fosseta loreal, que comunica-se com o cérebro, está situado dos dois lados da face, entre o nariz e os olhos, e tem a função de um termoreceptor, sendo sensível à radiação infravermelha, e é capaz de responder a pequenas variações de temperatura.

Os animais de sangue quente emitem radiação na faixa de 10µm, sendo assim de fácil detecção para as cobras possuidoras da fosseta loreal. Essa habilidade de detecção é útil principalmente durante a noite, em que a visão é prejudicada. Porém, além de ser útil na predação, a captação da radiação infravermelha por esses receptores térmicos é empregada também na termorregulação, orientação espacial e na proteção contra os danos do calor, facilitando à cobra a encontrar refúgios com temperatura agradável. (1,3)

No intuito de conhecer melhor este órgão, diversos trabalhos foram realizados, a maioria no âmbito comportamental, morfológico e fisiológico (medição da resposta do sinal através do nervo trigêmeo).

A motivação ocorreu ao se notar uma carência desse estudo no contexto neurofisiológico com algumas indagações sobre como o sistema sensorial infravermelho se comporta quando um estímulo com diferentes características é apresentado à serpente.

Sendo assim o presente trabalho visa estudar este sistema sensorial neurofisiologicamente, realizando as medições de resposta do sinal da cobra (no caso a cascavel- *Crotalus durissus*) diretamente no teto óptico, que é o responsável tanto pela informação infravermelha quanto pela informação visual. Para isso desenvolvemos um conjunto de estímulos dinâmicos artificiais (construção de falsas presas e de um background) que será exibido para a cobra. A velocidade do movimento do estímulo é variada e a temperatura tanto do estímulo quanto do ambiente (background) também é variada,

causando um contraste (estímulo com temperaturas menores que a temperatura corporal da cobra também serão investigados).

Com isso pretende-se medir a influência da sensibilidade do contraste causado e o quanto a velocidade do movimento do estímulo (falsa presa) influencia na resposta da cobra.

2 RADIAÇÃO INFRAVERMELHA (IR) E CORPO NEGRO

Nesta seção, será apresentada uma breve discussão sobre a radiação infravermelha, sua percepção no reino animal e principalmente sua utilização pelas cobras.

2.1 Radiação Infravermelha (IR)

Todos os corpos que vibram atômicamente promovem geração de calor, e todos os corpos com temperatura superior a 0°K emitem radiação infravermelha. O zero absoluto é a temperatura em que todos os movimentos atômicos cessam (quanto maior a temperatura de um corpo, maior a agitação das moléculas e átomos e maior a liberação de radiação infravermelha).

O olho humano se fosse sensível à radiação infravermelha (3-10 μm) à temperatura ambiente, não haveria a necessidade de uma iluminação artificial (pois tudo seria visível durante o dia e à noite apenas objetos frios seriam invisíveis; exceto objetos com temperaturas homogêneas).

Em um ambiente como descrito acima, a maioria dos seres vivos se destacariam nitidamente (exceto animais ectotérmicos), devido à dissipação de calor do corpo que se faz por radiação infravermelha, e que é dependente do fluxo, volume sanguíneo e termogênese. (27,28) Porém a radiação infravermelha é invisível aos olhos humanos, pois situa-se na faixa do espectro eletromagnético entre microondas e a luz visível. (figura 1)

Figura 1 - Espectro eletromagnético. (32)

A radiação infravermelha tem um comprimento de onda entre 0.7-1000 μ m, que está adjacente aos comprimentos de onda longos (ou final vermelho do espectro da luz visível), sendo mais longa que a luz visível. Por ser uma onda eletromagnética, ela não necessita de um meio de propagação, podendo assim se propagar pelo vácuo com a velocidade da luz. Ela pode ser dividida em três categorias: radiação infravermelha curta (0.7-1.5 μ m), média (1.5-10 μ m) e longa (10 -1000 μ m).

Por volta de 1620, Francis Bacon concluiu que havia um calor radiativo distinto da luz, e que poderia ser filtrado pelo vidro. Em 1664, a natureza da luz branca foi demonstrada pela primeira vez quando Newton decompôs a luz solar através de um prisma, projetando-a na tela. A imagem alongada e colorida do sol foi chamada por ele de espectro. E em 1800, um astrônomo inglês, de origem alemã, William Herschel, colocou um termômetro de mercúrio no espectro que obteve por um prisma de cristal com a finalidade de medir o calor emitido por cada cor. Ele descobriu que o calor era mais forte ao lado do vermelho do espectro, observando que ali não havia luz. Esta foi a primeira experiência que demonstrou que o calor pode ser captado em forma de imagem, como acontece com a luz visível.

2.2 Radiação Infravermelha no Reino Animal

A temperatura é uma variável importante do meio ambiente. Dentro do reino animal algumas espécies percebem e utilizam as mudanças na energia térmica no seu ambiente através de receptores infravermelhos. A captação da radiação infravermelha por esses receptores pode ser empregada em diversas maneiras, como por exemplo, na termorregulação, na detecção de uma presa ou na proteção contra os danos do calor.

Os morcegos – da espécie *Desmodus rotundus* se alimentam de sangue de vertebrados endotérmicos. Eles possuem três receptores de radiação infravermelha na face, localizados próximo às estruturas nasais, ajudando-os a localizar as presas. O sistema infravermelho desses morcegos muito se assemelha ao das cobras peçonhentas. (1)

Os besouros da espécie *Melanophila acuminata* possuem dois receptores infravermelhos localizados em cada lado do tórax. Eles conseguem detectar radiação emitida a longas distâncias, 60-100 milhas, e o órgão receptor é coberto por uma cera, protegendo-o de dessecações, fumaças e de acúmulo de sujeiras. Esse receptor é termomecânico, e converte radiação eletromagnética em energia mecânica. (1)

Algumas borboletas (*Pachliopta aristolochiae*, *Pieris brassicae*, *Gonepteryx tagala*, *Troides rhadamathus plateni*, *Aristolochia tagala*, *Vanessa io* e *Argynnis paphia*) mantêm a temperatura corporal através da termoregulação feita na maioria das espécies pela asa. Nas *Troides*, os termoreceptores estão localizados nas veias das asas. (1)

Algumas cobras também possuem receptores infravermelhos - as cobras peçonhentas são uma delas, como por exemplo, a família Boidae (boas), a família Pythonidae (pítons) e a subfamília Crotalinae da família Viparidae. (1,3-4) Essas cobras integram a informação da visão com a radiação eletromagnética, “vendo” assim a imagem térmica do ambiente em que se encontra, podendo encontrar potenciais presas ou evitar predadores, (8) além de servir também, como orientação espacial.

Logo, dependendo das espécies, os receptores infravermelhos podem possuir estrutura e posição variadas, como por exemplo, na região do focinho das cobras ou no lado ventral do tórax ou do abdômen de besouros. (1,8)

2.3 Cobras e a Radiação infravermelha nas cobras

As cobras (ordem Squamata - subordem Serpentes) são répteis que possuem um corpo alongado com a ausência de membros locomotores, pálpebras unidas e ouvido interno. Elas são encontradas em toda a parte do mundo, principalmente em regiões temperadas e tropicais, pois como não possuem uma temperatura corporal constante (são ectotérmicos, ou seja, a temperatura do corpo depende da temperatura do ambiente), necessitam do calor externo para a regulação da temperatura corporal, habitando esses tipos de regiões. Podem ter hábitos terrestres, arborícolas, aquáticos ou subterrâneos. (13)

Elas são carnívoras e conseguem ingerir suas presas inteiras, já que possuem na cabeça, uma série de ossos articulados capacitando-as a uma grande abertura da mandíbula (podendo abrir a boca em até 150°, enquanto os humanos abrem apenas 40°). Elas podem alimentar-se de invertebrados (artrópodes, moluscos, minhocas) e vertebrados (peixes, anfíbios, aves, mamíferos e outros répteis, incluindo outras serpentes). (13)

Como visto na seção 2.2, existem vários animais que possuem receptores infravermelhos, como algumas cobras peçonhentas, e elas conseguem detectar radiação infravermelha na faixa de 10µm, que é a mesma faixa de emissão infravermelha de animais de sangue quente (aves e mamíferos). Essa detecção é feita pela fosseta loreal, que é um órgão localizado no focinho da cobra, em ambos os lados, entre o nariz e os olhos. (2-6) Esse órgão possui uma membrana inervada com terminações nervosas ligadas ao cérebro e que consegue perceber variações de calor de até 0.003°C. (1-2,15) Quando um animal de sangue quente emana radiação, esta atinge a membrana e leva essa informação ao cérebro, criando uma imagem térmica da presa e do ambiente (figura 2), fornecendo o tamanho do animal (através das concentrações dos raios infravermelhos), e os movimentos (pelo deslocamento da 'imagem térmica'). (1)

Figura 2- Imagens térmicas de como ratos são vistos por uma cobra que possui um sistema sensorial infravermelho. (10, 33)

Veremos mais sobre a morfologia deste órgão nas próximas seções.

3 CASCAVÉIS

Cascavéis são membros da família Viparidae e da subfamília Crotalinae, e que além da cascavel, fazem parte também dessa subfamília, quinze a dezoito outros gêneros de cobras, distribuídas entre a América e o sul da Ásia. Essas cobras variam tanto em tamanho quanto em peso, podendo ter até dois metros e meio de comprimento e pesar nove quilos. (13)

As cascavéis (*Crotalus*-figura 3 e *Sistrurus*) possuem uma camada externa de pele recoberta por queratina que trocam de tempos em tempos, e sua coloração é na maioria das vezes marrom ou cinza, mas pode ser também amarela e laranja. Elas possuem na ponta do rabo um chocalho, que é substituído por outro maior, à medida que a cobra vai envelhecendo e crescendo. Elas possuem receptores que detectam calor, as chamadas fossetas loreais. Sua termoregulação é controlada ajustando a sua atividade durante o dia (buscando um local com temperaturas ideais), logo ela é um animal ectotérmico, assim como os répteis e anfíbios. A temperatura corporal de uma cascavel é entre 21°C e 32°C. (13)

As cobras não possuem tímpanos, pois eles seriam pouco eficazes na altura do chão, logo, elas possuem o martelo (osso entre o maxilar e o ouvido interno) que transmitem as vibrações do solo para o cérebro.

O olfato difere bastante dos mamíferos. Elas não conseguem sentir cheiro com o nariz, porém conseguem suprir isto com a língua aparente, ao colocá-la para fora, captando o cheiro do ar e levando a mensagem até o órgão de Jacobson. (13)

A

B

Figura 3 - A) Figura de uma cascavel (*Crotalus*) (34). B) Cascavel (*Crotalus*) em que se pode observar a fosseta loreal. (35)

4 MORFOLOGIA, INERVAÇÃO E A VIA SENSORIAL DA PERCEPÇÃO INFRATERMELHA NA FOSSETA

As serpentes, no nosso caso a cascavel, possuem dois orifícios – como já citado na seção anterior, bilaterais, localizados entre o nariz e os olhos, chamados de fosseta loreal. (figura 4)

Figura 4 - Fosseta loreal de uma cascavel.

Esse orifício consiste em uma depressão onde se encontra uma membrana que o divide em uma câmara interna e externa. (figura 5). (5-7) Essa membrana possui cerca de 40x40 células sensoriais com um campo de visão de aproximadamente 100° de extensão (imagine um cone saindo da fosseta), o que representa uma resolução da imagem térmica, de um objeto formado no cérebro, de aproximadamente 2,5°. (12) Essa membrana possui uma espessura de 15µm e é preenchida por ar em ambos os lados. (1,9) Ela é projetada a partir dos ramos maxilares e oftálmicos do sistema nervoso terminal (TNS) que contém as massas nervosas terminais (TNM).

Figura 5 - Seção transversal da fosseta loreal da família Crotalinae, indicando a membrana da fosseta que é envolvida pelas câmaras interna e externa (12).

As fibras dos nervos terminais do ramo oftálmico inervam a parte dorsal da membrana, já no ramo maxilar, temos dois feixes dessa fibra que inervam a parte ventral e a parte do focinho da membrana. Essas fibras são fibras A-delta mielinizadas, porém a membrana também é inervada por fibras C amielínicas. Ao entrar na membrana, as fibras nervosas A-delta perdem seu revestimento de mielina e se ramificam em um padrão parecido com a palma de uma mão. Cada ramo nervoso dessas fibras formam um agregado de fibrilas com mitocôndrias que são entrelaçadas ao redor das Células de Schwann – que são as principais células gliais do sistema nervoso periférico, sistema esse que faz a ligação entre o sistema nervoso central e o resto do corpo da cobra. Esse agregado é o chamado sistema nervoso terminal (TNS). (5-6,16) Já as fibras C amielínicas, provavelmente não são receptivas e participam somente no processo de controle sanguíneo das veias da membrana. (5,16) Por esses motivos é que a fibra A-delta é também chamada de fibra quente, pois está diretamente relacionada à percepção de calor da cobra (isso se deve ao fato de que ela transmite o estímulo mais rapidamente, por ser mielinizada) e as fibras C amielínicas não estão envolvidas nesta parte do processo, pois são delgadas e com baixa velocidade de neurotransmissão. (5)

Portanto a radiação infravermelha captada pela fosseta loreal, produz potenciais de ação nos receptores das massas nervosas terminais (TNM), estes que estão localizados nas pontas da terminação de longos axônios da membrana, que contém uma densa concentração de mitocôndrias e enzimas oxidativas e estende-se pelas células epiteliais, produzindo flutuações na saída dos neurônios trigêmeos (TG). (figura 6)

Figura 6 - Seção transversal da fosseta loreal da família Crotalinae, indicando a membrana da fosseta que é envolvida pelas câmaras interna e externa (12).

As TNMs estão associadas com as células de Schwann, que são as principais células gliais do sistema nervoso periférico e que produz a mielina, que envolve os axônios dos neurônios no sistema nervoso periférico, isolando eletricamente os nervos e assim permitindo a propagação rápida de potenciais de ação por impulsos saltatórios.

Figura 7 - Inervação da fosseta loreal. A fosseta loreal (vermelho) é innervada por três ramos do nervo trigêmeo (amarelo). C: Cerebelo, E: olho (azul), IC: colículo inferior, MO: medula oblongata, N: nariz (verde), OB: bulbo olfatório, OT: teto óptico, P: fosseta loreal, SC: espinha vertebral, V: gânglio trigêmeo, V1: ramo oftálmico do trigêmeo (gv1 é seu gânglio), V2: ramo maxilar do trigêmeo (gv2 é seu gânglio), V3: ramo mandibular do trigêmeo (gv3 é seu gânglio), V2d: ramo profundo do ramo maxilar; V2s: ramo superficial do ramo maxilar. (5)

Os dendritos (numerosos prolongamentos dos neurônios especializados na recepção dos estímulos nervosos e que fazem parte do nervo aferente, que são os responsáveis por conduzir sinais sensoriais para o sistema nervoso central - da pele ou dos órgãos dos sentidos) do TNMs convergem para nervos cujos feixes levam ao nervo trigêmeo (TG, V da figura 7) que é constituído pelo gânglio oftálmico (gv1 da figura 7), gânglio maxilar (gv2 da figura 7) e o gânglio mandibular (gv3 da figura 7). (5-7,11)

Essas fibras aferentes (dendritos) do nervo trigêmeo terminam nos neurônios do núcleo do nervo trigêmeo (LTDD) e do trato descendente lateral (ltd)¹, que faz parte da medula oblongata (bulbo, que é a metade inferior do tronco cerebral e que ajuda na transferência de mensagens entre diferentes partes do cérebro e da medula espinhal), onde o início do processamento da informação infravermelha começa. (1,5,11) Portanto a saída as flutuações produzidas na saída dos neurônios é processada na medula oblongata, mas

¹ O ltd é constituído de fibras dos nervos trigêmeos, são fibras A-delta mielinizadas de 1-5µm ou fibras C amielínicas de 0,1-2 µm. Já o LTDD é composto de uma parte corporal e de uma parte caudal, sendo essa mais estreita. A parte corporal projeta-se da superfície lateral da medula oblongata, avançando até a parte caudal, que estende-se para a coluna cervical (7).

precisamente no LTDD como já dito, e a informação é então passada para o teto óptico (figura 4). (6,8)

Essa informação ao chegar ao teto óptico (figura 8) é integrada com a informação visual também recebida e então mandada para os centros superiores do telencéfalo, onde a imagem térmica do objeto e do ambiente é então formada. (5-6)

Figura 8 - Figura do cérebro de uma cascavel. Parte central indica o teto óptico.

A contribuição de um canal iônico chamado TRPA1 (receptor de potencial transiente anquirina 1) também é importante para a detecção da radiação infravermelha. Esse canal está localizado nos neurônios das fossetas e produz de 100 a 400 vezes mais RNA no gânglio trigêmeo do que nos gânglios dorsais (que são responsáveis de fornecer ao cérebro a informação sensorial que provém do pescoço para baixo). Quando a radiação atinge a fosseta loreal, aquece a membrana localizada na fosseta e consequentemente o canal TRPA1, que se abre quando um limiar de temperatura é alcançado (27.6°C), (5,10,14,18) permitindo que os íons fluam para os neurônios, desencadeando assim o impulso nervoso.

Porém como a sensibilidade da temperatura nas cobras consegue ser menor do que esse limiar de temperatura, estudos ainda precisam ser efetuados para um melhor entendimento do funcionamento desse canal iônico. (14,18) Este canal (TRPA1) em humanos (e mamíferos em geral) é o responsável por alertar o sistema sobre dores inflamatórias e detectar irritantes químicos nocivos ao corpo. (14,18)

A fosseta loreal da cobra é caracterizada por uma cavidade, ou seja, um recinto fechado no qual há um pequeno furo, em que toda a radiação incidente é absorvida e as reflexões existentes se transformam em praticamente uma absorção completa. (1,4,12) Já um corpo negro (figura 9) é um corpo que emite ou absorve radiação eletromagnética, em todos os comprimentos de onda, de tal forma que a radiação é absorvida e a máxima radiação possível para a temperatura do corpo é emitida (considerando todas as direções e comprimentos de onda), sendo assim a fosseta considerada um corpo negro.

Figura 9 - Ilustração de um corpo negro, que possui uma cavidade por onde os raios entram.

4.1 Processamento da informação infravermelha e a Formação da imagem na fosseta loreal

Como visto na seção anterior, os potenciais de ação gerados pela fosseta loreal passam pelo gânglio trigeminal até chegar à medula oblongata. Na medula, o sinal é processado pelo trato descendente lateral e pelo núcleo descendente lateral do nervo trigêmeo (ltd e LTDD, respectivamente), para assim, ser encaminhado para o teto óptico contralateral. (7) As vias descendentes laterais são fibras que se originam no córtex e que fazem a sinapse com os neurônios.

Depois desse processamento, a informação é repassada para o teto óptico contralateral, onde os campos da visão e da fosseta loreal se sobrepõem. (5) A partir deste ponto, a informação segue para o núcleo rotundo (RC, região que transmite informações

para as áreas visuais do telencéfalo) do tálamo até chegar ao seu destino final, o telencéfalo. (1,5,9,11)

No teto óptico, temos três tipos de sinais de neurônios diferentes que podem ser gravados, o sinal do neurônio da visão, o do infravermelho e o de ambos juntos. Nesta porção do teto forma-se a imagem chamada estereoscópica, pois a cobra constrói a imagem do “objeto” que elas detectam pelos olhos juntamente com a cor “infravermelha”. Essa estereoscopia, que simula as duas imagens e que posteriormente o cérebro irá fundi-las, fornece informações sobre a distância, tamanho e posição da presa. (5)

O caminho dos dois sistemas, tanto visual quanto infravermelho, seguem o caminho oposto em relação à orientação de entrada, ou seja, contralaterais, como já falado anteriormente. O lado e a região da fosseta da cobra que capta radiação infravermelha é processada na parte frontal do lado oposto no teto óptico (9), ou seja, o raio infravermelho que atinge a fosseta da esquerda na posição 4, segue para a parte frontal do teto óptico do lado oposto; e da mesma forma, a parte de trás do teto óptico (raio número 4 da figura abaixo) recebe a entrada do sinal infravermelho das partes frontais da fosseta e dos olhos (raio número 1 da figura abaixo), sendo processada contralateralmente (9). Exemplificando:

Figura 10 - Caminho dos raios infravermelhos (raios vermelhos) até o teto óptico. Os raios que vêm da posição 1 atingem a fosseta e seguem para o núcleo do nervo trigêmeo (LTTD), de lá o sinal segue para o núcleo rotundo (RC) até finalmente chegar à parte frontal do teto óptico 1 (contralateral). O mesmo ocorre com o sinal da visão (raio verde), como pode ser observado.

A formação da “imagem” infravermelha depende também da geometria da fosseta loreal (1,9). A abertura da cavidade da fosseta, a profundidade da abertura, a distância da abertura até a membrana e a orientação do plano de abertura são fatores que podem ajudar ou prejudicar nessa formação da imagem. (4-5). O formato da fosseta varia de espécie para espécie, e temos aberturas arredondadas, triangulares e retangulares. Em cobras com hábito arbóreo, a abertura é geralmente direcionada para baixo. Há também serpentes que possuem mais de uma fosseta loreal de cada lado do focinho, como por exemplo, a píton, que possuem três cavidades de cada lado. (5,9)

Essa diferença na geometria da fosseta loreal faz com que alguns ângulos sejam mais significativos para a cobra “enxergar” a sua presa, (9,12) ou seja, há “ângulos ótimos” para a gravação dos estímulos, (4) mas isso também varia de espécie para espécie.

Figura 11 - Posição da cobra para estipular com quais ângulos há uma maior resposta à um estímulo. A) Ângulos de 90° a 150° com maior resposta, B) Ângulos de 70° a 110° com maior resposta e C) Ângulos de 50° a 130° com maior resposta. Em vermelho temos indicado a fosseta loreal.

Esses ângulos foram medidos a partir do nervo trigêmeo e do teto óptico (figura 11). O estímulo percorria um arco em frente à cobra, ao lado ou perpendicular ao plano em que

se encontrava a cobra, este arco ia de 0° a 180°, e as medições variavam de 10° em 10°, obtendo assim os ângulos com maior resposta da cobra ao estímulo apresentado (lâmpada incandescente de 6V) (4).

Logo, essa geometria da fosseta é muito importante para a serpente, pois ela é dependente desse sistema para sobreviver, caçar, se proteger, já que esse sistema infravermelho constitui uma parte da “visão” das serpentes, e o mesmo é utilizado quando sua visão é prejudicada pelo escuro.

4.2 O “papel” do background na percepção da radiação infravermelha

As cobras captam radiação infravermelha em comprimentos de onda na faixa de 8-10µm. Através do experimento de Bullock e Diecke descrito anteriormente em que a sensibilidade da fosseta loreal em relação à temperatura é de 0.001°C demonstra que a mudança de temperatura em qualquer ponto da membrana da fosseta implica em uma mudança de temperatura também no mesmo ponto da TNMs (5). Essa sensibilidade na temperatura associada ao background do ambiente em que a cobra se encontra favorece a mesma, tanto para capturar presas como para fugir de predadores.

Logo as cobras detectam a temperatura do estímulo enviado a elas, sendo ele mais quente ou mais frio que o background. A sensibilidade máxima dos receptores infravermelhos depende da temperatura de onde a cobra se encontra (figura 12). Portanto, se temos um aumento de temperatura de 'algo' no ambiente, os receptores exibem um aumento na frequência da resposta neuronal, e consequentemente, uma diminuição na temperatura de um objeto no ambiente, diminui a frequência da resposta neuronal. (1,4,6)

Figura 12 - Imagem de uma câmera térmica de uma cobra comendo um rato (36).

Algumas cobras peçonhentas possuem uma "visão" (com máxima sensibilidade na faixa de 3-10 μ m) que lhes permite e ajudam a apanhar suas presas à noite. Isso se deve ao fato de que animais de sangue quente (mamíferos e aves) emitem radiação infravermelha nesta mesma faixa de absorção das cobras (infravermelha 8-10 μ m). Essa "sensibilidade do sensor infravermelho" consegue perceber variações de calor de até 0.003°C e consegue captar uma radiação infravermelha de 10.75 μ W/cm.² (1,15,17)

Ebert e Westhoff (8) calculam o contraste da radiação através do contraste de temperatura entre o background e o estímulo através da seguinte equação:

$$I_c = \frac{\sigma A(T_2^4 - T_1^4)}{\pi D^2} \quad (1)$$

Em que σ é a constante de Boltzmann, T_2 é a temperatura do estímulo em graus Kelvin, T_1 é a temperatura do background em graus Kelvin, D é a distância entre o estímulo e a fosseta loreal e A é a área do estímulo utilizada.

Considerando para este trabalho $\sigma = 5,6522 \cdot 10^{-12}$ W/cm²K⁴, $D = 10$ cm, $A = 6,157$ cm² (área do estímulo com raio de 0,7cm), $T_2 = 40^\circ\text{C}$ (313,15K) e $T_1 = 37^\circ\text{C}$ (310,15 K) temos, como alteração do fluxo de radiação que chega à fosseta devido ao contraste de temperatura (3°C):

$$I_c = 4,0237 \cdot 10^{-5} W/cm^2 = 0,000040237 mW/cm^2 \quad (2)$$

Com esse cálculo, podemos saber a energia que a fosseta recebe devido a este contraste, através da equação:

$$I_c = \frac{P}{A_f} \quad (3)$$

Considerando que o raio de abertura da fosseta loreal de uma cascavel é $1mm$, temos um valor de $0,031416cm^2$ para a área da fosseta (A_f), e assim, a energia que ela recebe é de:

$$P = A_f \cdot I_c = 1,264 \cdot 10^{-6} W \quad (4)$$

Para um contraste de temperatura entre estímulo e background observados em um dos experimentos realizados, temos $T_2=45^\circ C$ ($318,15K$) e $T_1=10,9^\circ C$ ($284,05 K$), e assim:

$$I_c = 4,138 \cdot 10^{-4} W/cm^2 = 41,38 mW/cm^2 \quad (5)$$

$$P = 1,3 \cdot 10^{-5} W \quad (6)$$

Essa variação de calor foi estudada e trabalhada², em que um fluxo de água passava pela membrana da fosseta loreal enquanto a mesma estava excitada e simultaneamente, a diferença de calor era medida, obtendo esse valor. Porém os aparatos utilizados neste experimento não podiam prever uma variação de temperatura menor, portanto os autores sugeriram que esta variação poderia chegar até a $0.001^\circ C$. Outros trabalhos, comportamentais e teóricos, foram posteriormente feitos para provar este valor, e alguns chegaram a sugerir a mesma conclusão, de que a fosseta consegue detectar variação em até $0.001^\circ C$ ³.

² Bullock e Diecke (30)

³ Stanford e Hartline (31)

Experimentalmente, observa-se que a intensidade da radiação emitida é maior quanto maior forem as frequências e sua temperatura. Ou seja, quanto maior for a temperatura do corpo, maior será a abundância de radiação de alta frequência sendo emitida por ele.

Figura 13 - Radiação espectral de um corpo negro para 25°C e a transmitância atmosférica para 1m e 1km. (adaptado -28)

O gráfico acima mostra a transmitância para diversas condições atmosféricas e também o espectro de radiação de um corpo negro a uma temperatura de 25°C. Percebe-se que o pico é na faixa 8-12µm, concordando com a percepção que a cobra tem da radiação infravermelha, que é na faixa de 8-10µm. (2,4-6) Esse trabalho foi uma correção do trabalho de Jones, (29) em que a máxima transmissão através da atmosfera ocorria na região entre 9-11µm e ia para zero em 8 e 12.5µm (devido a absorção do dióxido de carbono e vapor de água pela atmosfera), incluindo assim a radiação de corpo negro na banda de 9-11µm e excluindo 85% da radiação total emitida do corpo negro. Bakken corrigiu essa caracterização incorreta da transmissão atmosférica da radiação, digitalizando vários comprimentos de onda de diferentes gases na região de 4-27µm e calculando a radiação de um corpo negro

nas mesmas temperaturas do trabalho de Jones, tendo como resultado que a atmosfera transmite consideravelmente mais do que a banda de 9-11 μ m e que a 1m de distância a atmosfera transmite então 92-95% da radiação de um objeto, diferente, portanto de Jones, em que a radiação do corpo negro que chegava à fosseta era cerca de 15.9-16.5%, levando a uma distância de detecção de apenas 5cm do objeto à cobra.

Desta forma é dito que a fosseta loreal funciona como um corpo negro, em que a radiação de um objeto atinge a membrana da fosseta (mais precisamente as massas nervosas terminais TNM) permitindo a determinação do ângulo (posição) deste objeto (8,9). O maior problema da fosseta é que a resolução espacial aumenta de acordo com o decréscimo da abertura, porém diminui a sensibilidade da mesma, visto que quanto menor a abertura, menos radiação entrará na fosseta, (8) e o tamanho da fosseta além de variar de espécie para espécie, varia sutilmente dependendo do tamanho e idade do animal.

5 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Muitos trabalhos já foram efetuados no âmbito de entender melhor a morfologia da fosseta loreal e como ela funciona. A maioria dos trabalhos são comportamentais ou fisiológicos, e parte concentrada no estudo da fosseta neurofisiologicamente.

Em estudos fisiológicos descritivos, temos o trabalho de Campbell, (1) em que ele estuda os diversos tipos de termosensores biológicos (principalmente o das cobras), sua estrutura e função e sobre como a microscopia eletrônica é um aliado para o entendimento dessas estruturas. Bullock (11) estuda a histologia da fosseta e a disposição e degeneração dos nervos constituintes a ela, assim como no trabalho de Hartline (24) e o estudo histológico do nervo trigeminal feito por Molenaar. (25-26) Changjong (15) faz uma revisão sobre as estruturas do sistema sensorial infravermelho dando ênfase ao nervo trigêmeo das cobras.

Nos estudos fisiológicos do nervo trigêmeo e teto óptico, Changjong, (3) aplicou etanol no coração (geralmente o etanol muda a temperatura da pele, fluxo de sangue e o diâmetro vascular) e estimulou a cobra com uma mão e um bloco de gelo para analisar a resposta na presença do etanol. A resposta obtida da cobra quando a mão é exibida mostra spikes sendo que há a supressão quando a mesma é removida, ocorrendo o inverso quando o bloco de gelo é exibido, ou seja, não há spikes como resposta, porém ao retira-se o gelo, há excitação. Com isso ele concluiu que a resposta infravermelha ocorre a um efeito químico dos receptores que são sensíveis à temperatura ou devido à vasodilatação da membrana da fosseta.

Terashima e Goris (21) mediram o limite da área receptiva da fosseta através de um estímulo (lâmpada 650W) que passa em frente à cobra (em um arco), obtendo spikes (através do teto óptico) e chegando à conclusão de que o ângulo de 60° representa a área receptiva que é visível através da abertura da fosseta (medição feita através de um micromanipulador que digitalizou o local através da membrana da fosseta). Kohl (23) utilizou um emissor infravermelho (3 μ m) para o estudo neurofisiológico do nervo trigêmeo, variando as distâncias e orientações. Kohl chegou à conclusão de quanto maior a distância, mais fraco é o sinal da resposta da cobra. Newman (9) estudou a fosseta ao gravar a atividade de uma única célula tectal através de um microeletrodo. Ele utilizou um ponto circular iluminado como estímulo e chegou à conclusão de que a organização espacial

infravermelha segue a mesma regra que a visual, ou seja, a informação da radiação infravermelha que chega à fosseta direita segue para o teto óptico esquerdo e vice-versa.

Comportamentalmente, temos Ebert (17,27) com o intuito de determinar o limiar comportamental da cobra a estímulos, verificando a língua mexendo, cabeça virando e cauda batendo. A cobra se encontra solta em uma arena e uma placa peltier (estímulo à 34.5°C) é suspensa e movimenta-se pela arena, mudando a distância e aproximando-se da cobra. Chegou-se a conclusão de que a resposta da cobra à distância é cerca de 1m. No segundo trabalho, há resultados comportamentais e fisiológicos, e ele utiliza um laser em que aumenta-se a intensidade, chegando a conclusão de que quanto maior a intensidade, maior a resposta da cobra. Neurofisiologicamente, ao gravar os potenciais de ação do teto óptico, percebeu-se a mesma coisa, ao aumentar a intensidade do laser, a cobra responde mais satisfatoriamente, ou seja, a intensidade de spikes é maior.

Dyke (20) utilizou como estímulos, balões pretos com água quente (24°C) ou fria (12°C). A cobra ficava solta dentro de uma arena circular de temperatura controlada para criar contraste com os balões. Testes foram feitos com balões quentes e arena fria, balões frios e arena quente e sem contraste entre eles. Observou-se que ela responde tanto os balões quentes ou frios, porém ela se direcionava ao balão quando o mesmo era quente e ficava confusa com o balão frio, porém respondia de certa forma que o identificava na arena (provavelmente pelo fato do balão frio fazer uma “sombra” em contraste com a arena quente). Safer (22) utilizou balões também dentro de uma arena com temperatura ambiente, porém mostrados em pares, e sempre um com a água um pouco mais quente que o outro (cerca de 10°C de diferença). Safer concluiu que a cobra percebia e tentava dar o bote na direção do balão quente, enquanto praticamente não percebia a existência do balão frio. Nesses três trabalhos, as cobras permaneciam com os olhos tampados por fita preta.

Goris efetuou diversos trabalhos, dois deles (2,5) focam no entendimento da morfologia e inervação da fosseta, explicando a função, estrutura, conexões com o cérebro e como a percepção de um estímulo acontecem e são enviados ao cérebro. Neurofisiologicamente, seus trabalhos mostraram a resposta da fosseta quando a mesma era estimulada por uma lâmpada, pessoa, cigarro, gelo, (4,19,21) e as gravações foram feitas pelo nervo trigêmeo e parte do teto óptico. Para estudar o sinal do nervo trigêmeo, Goris utilizou uma lâmpada (500W), uma mão, um cigarro e cubos de gelo dentro de uma sacola plástica. Notou-se que a resposta aumentava à medida que o estímulo emitia uma radiação maior, porém não foi

determinado a sensibilidade da fosseta. Quando o cubo de gelo foi apresentado à cobra, não havia resposta considerável, porém quando retirava-se o gelo, havia a percepção da cobra e a mesma respondia, por pouco tempo, até os potenciais de ação entrarem em estado espontâneo (natural) de resposta. Ao estudar o teto óptico, Goris utilizou uma lâmpada incandescente (6V) e um gelo, como estímulos, com o intuito de desvendar qual o campo de visão, vertical e horizontal, dos receptores da fosseta. Ele estimulou a cobra com a lâmpada passando por três eixos diferentes: na frente dela (experimento um), ao lado dela (experimento dois), e perpendicularmente ao plano em que ela estava (experimento três), todos em um arco de 180°. Os ângulos com mais respostas aos estímulos foram os ângulos entre 30° a 90° do lado ipsilateral e 90° a 150° do lado contralateral do primeiro experimento, ângulos entre 50° a 130° do experimento dois e 70° a 110° do experimento três. Determinando a região de maior resposta da fosseta.

Outros estudos foram efetuados no contexto de medir e observar a variação do fluxo sanguíneo da fosseta quando a cobra era estimulada (por lasers (6,16) e soldadores (16)), chegando à conclusão de que a resposta do fluxo de sangue se deve somente à atividade dos receptores infravermelhos.

Estudos em andamento sobre um canal iônico (TRPA1) que se abre quando um patamar de temperatura é alcançado permitindo que os íons passem para as células nervosas desencadeando um sinal elétrico e assim ajudando as cobras a encontrar suas presas no escuro, também estão em destaque, sendo realizados por Julius (19), Panzano (14) e Gracheva, (18) porém ainda há a necessidade de entender o funcionamento deste canal iônico para concluir no que realmente ele faz parte e ajuda na percepção do sinal infravermelho.

Teoricamente, temos Sichert, (19) que faz a reconstrução de um modelo ("lentes virtuais") para explorar como as cobras superam as limitações óticas da fosseta, chegando a conclusão de que a abertura da fosseta não inibe uma formação clara da imagem neuronal da distribuição espacial do calor, porém a resolução é limitada pelo pequeno número de receptores de calor presentes na fosseta. Krochmal (28) analisa teoricamente a transferência de calor que é utilizada para converter a radiação de uma imagem para temperaturas da membrana da fosseta, chegando à conclusão de que o limiar de percepção de contraste do sensor infravermelho das cobras pode ser menor que o apresentado por Bullock e Diecke (0.001-0.003°C). Jones (29) modela o processo de transferência de radiação de um objeto à

37°C na fosseta para verificar a sensibilidade do sensor infravermelho em termos de que distância se dá essa percepção. Ele chega à conclusão de que essa percepção se dá somente a menos de 5 cm. No entanto, seu trabalho foi corrigido por Bakken, (28) que refez os cálculos considerando condições mais realistas sendo: uma faixa maior de o comprimento de onda (antes sendo 9-11 μ m para 4-27 μ m) e considerando a transmissão atmosférica nesta faixa de onda, chegou à conclusão de que essa distância é cerca de 1m.

Como pôde ser observado, muitos trabalhos foram feitos nesta área. A motivação deste trabalho aconteceu ao analisar os estudos feitos por Goris, Ebert e Dyke, surgindo assim algumas indagações sobre o comportamento do sistema sensorial infravermelho da cascavel.

Portanto, o intuito deste trabalho é criar um ambiente experimental permitindo o estudo do sistema sensorial (neurofisiologicamente) quando um estímulo dinâmico (construção de falsas presas) é apresentado à cobra. Iremos variar a temperatura tanto dos estímulos quanto do ambiente (background que também será criado) para estudar a resposta da cobra ao contraste causado pelos dois, e também quando ocorre a variação da velocidade do movimento das falsas presas. Como as medições serão realizadas no teto óptico da cascavel serão estudados os métodos de como obter estes sinais extracelulares.

6 METODOLOGIA

6.1 Procedimento Cirúrgico

As cobras utilizadas neste trabalho é a *Crotalus durissus* (cascavel), elas são mantidas e criadas por responsáveis da Universidade Estadual Paulista-UNESP, Campus de Rio Claro. As cobras são criadas em cativeiro e alojadas individualmente em uma caixa, com temperatura ambiente (cerca de 25°C), água e com uma dieta de um rato a cada 10 dias aproximadamente. Foram usadas 4 cobras para a coleta dos dados experimentais, tanto fêmeas quanto machos.

A serpente é anestesiada primeiramente com gás carbônico para efetuar a retirada de suas presas e de seu veneno. Após feito esse procedimento, a cobra é então anestesiada com uma concentração de 0.5% a 2% (% do ar movimentado - em torno de 50cm³; em torno de 0.25ml a 1ml por ciclo) de Isoflurano para a realização da cirurgia. Essa anestesia é administrada através de um tubo flexível inserido pela glote. Poderíamos também fazer um pequeno corte no lado do "pescoço" e inserir o tubo flexível através da traquéia, porém achamos menos invasivo e eficiente inserir pela glote (figura 14).

Figura 14 - Cobra (cascavel) sendo entubada para respiração artificial.

Essa concentração de Isoflurano também será utilizada para a operação inicial, em

que precisamos da cobra sem qualquer reflexo ou movimento. Simultaneamente neste cateter onde passa a anestesia, é induzida a sua respiração, de 5 a 10 ciclos (respiradas/min). A concentração do anestésico utilizado ao longo do experimento é definida de acordo com o tamanho, reflexo e resposta de cada cobra utilizada, porém na maioria das cobras utilizamos uma concentração de 0.5% (% do ar movimentado 50cm³).

A boca da cobra é costurada com um ponto de cada lado para que o tubo da respiração artificial permaneça no lugar e que possamos assim, imobilizá-la. A imobilização é feita com a cobra de barriga para baixo, em uma tábua de madeira, sendo que parte do corpo é presa por pedaços de fita. O pescoço é imobilizado com fitas de velcro e borracha acopladas a uma placa de alumínio em que a cabeça da cobra ficará em cima para a realização da cirurgia. (figura 15)

Com a cobra imobilizada, inicia-se a cirurgia através da retirada da pele da parte de cima da cabeça (como mostrado na figura 15) para expor o osso do crânio.

Antes de abrir o crânio, precisamos manter a cabeça da cobra fixa e para isso, vamos fixar uma haste de metal no osso frontal (osso entre os olhos). Este osso é muito fino, e precisamos ter cuidado. Esta haste será fixada com resina dental (VipiFlash Tipo 2), e precisaremos esperar alguns minutos para que a resina seque e ter a certeza de que a haste está segurando a cabeça da cobra. Um problema nesta parte pode ser o fato de que para fixar a cabeça da cobra com a haste, os fluídos de dentro da cabeça da cobra podem molhar a resina, e às vezes a haste não ficará totalmente fixa, necessitando assim um cuidado extra.

Com a haste fixa, a operação se iniciará com a exposição do crânio, e posteriormente o tecto óptico. Com o crânio exposto, uma broca dental (Beltec LB-100) será utilizada para desgastar e fazer cavidades no crânio, removendo assim um pedaço do osso para expor a parte do tecto óptico. Precisamos tomar muito cuidado novamente neste momento, porque esta área é perto da veia *Sinus*, e se houver a ruptura dessa veia, a cobra tem um sangramento e virá a óbito. Quando a cavidade for aberta, podemos ver a região do tecto óptico, onde serão inseridos os eletrodos de tungstênio através de um micromanipulador. No entanto, antes de colocar os eletrodos, nós iremos transferir a cobra, que vamos usar no decorrer do experimento, para dentro de uma gaiola de Faraday de dimensões 1mx70cmx60cm. Tendo em vista que o tecto óptico responde tanto pelos sinais visuais quanto pelos sinais infravermelhos (4), ao inserir o eletrodo no teto óptico, a penetração deve ser profunda, para assim assegurar melhor que a resposta obtida é, na maioria, sinais

infravermelhos. A referência do eletrodo será colocada na cabeça da cobra, entre a pele e o músculo exposto da cabeça (ver figura 15) e todo o procedimento cirúrgico é efetuado utilizando um estereomicroscópio com braço articulado (Leica).

A área do córtex exposta foi de aproximadamente 1 a 2 mm de diâmetro na maioria dos experimentos (figura 16).

Após a cirurgia e coleta de todos os dados, a cobra recebe uma overdose de anestésico seguida de decapitação, de acordo com o protocolo do grau de invasividade GI-3 do CEAU⁴ (Comissão de Ética no Uso de animais), visto que a mesma não sobreviveria após todos esses procedimentos citados acima serem efetuados.

Figura 15 - Passos da cirurgia efetuada na cascavel. A) Com a cobra entubada retira-se a pele do topo da cabeça. B) Fixa-se sua cabeça através de uma haste no osso entre os olhos (com resina de dentista). C) e D) Exposição do teto óptico, utilizando uma broca de dentista, com a retirada de uma parte do osso do crânio.

⁴ **GI3 = Experimentos que causam estresse, desconforto ou dor, de intensidade intermediária** (ex.: procedimentos cirúrgicos invasivos conduzidos em animais anestesiados; imobilidade física por várias horas; indução de estresse por separação materna ou exposição a agressor; exposição a estímulos aversivos inescapáveis; exposição a choques localizados de intensidade leve; exposição a níveis de radiação e compostos químicos que provoquem prejuízo duradouro da função sensorial e motora; administração de agentes químicos por vias como a intracardíaca e intracerebral).

Figura 16 - A) Teto óptico mostrando através da cabeça da cobra B) Teto óptico sendo mostrado através do microscópio; eletrodo penetrando nele.

6.2 Montagem dos estímulos e background

6.2.1 Background

O background foi criado através de um quarto de uma casca esférica de cobre (vide figura 17), de 14 cm de diâmetro. Essa casca esférica (cúpula) foi pintada por dentro com uma tinta fosca preta e que resiste a altas temperaturas (marca COLORGIN). Esse processo foi feito para melhorar a radiação infravermelha e diminuir a reflexão dos raios infravermelhos do ambiente a que será submetido esse background. Externamente à cúpula, é colocada uma espuma (Espuma expansiva SIKA) para isolar a parte de fora aumentando a isolamento térmica. Essa espuma foi colocada na forma de uma “caixa”, deixando sem isolamento somente a parte de trás do background, pois nele, será acoplada uma placa peltier. E para finalizar o isolamento, temos ao redor de toda essa espuma, um envoltório de alumínio, que irá servir de suporte para o motor responsável pela movimentação dos estímulos criados.

Figura 17 - A) Foto do semicírculo pintado de preto com o isolamento de espuma. Pode-se observar o estímulo (resistência circular) preso através de um braço dentro desta cúpula. B) Parte de trás da cúpula em que se pode observar o cooler acoplado.

Como dito, na parte de trás da cúpula, é colocada (com a ajuda de pasta térmica) uma placa peltier de dimensão 4x4cm. Com essa placa peltier podemos aquecer ou esfriar o background do estímulo. Temos também acoplado nesse peltier, o Water Cooling (Corsair H50 Intel LGA 1156).

Este cooler possui uma ventoinha de 12cm e um sistema de arrefecimento provido de uma bomba d'água. Esse sistema servirá para esfriar ou aquecer a placa peltier. Esse Cooler estará ligado a uma fonte de 5V (constante).

Figura 18 - Parte traseira da cúpula com o Water Cooling acoplado a ela.

Montamos um termostato que será acoplado na parte de trás da cúpula, que servirá de controle de temperatura do background, nos fornecendo a temperatura real do sistema à medida que variamos a mesma. Este termostato foi construído com um sensor LM35 fornecendo uma voltagem proporcional à temperatura.

Como podemos ver, a placa peltier será ligada a uma fonte (DC Power Supply MPL-1303) onde podemos controlar a temperatura da mesma, esfriando-a ou esquentando de acordo com a polaridade e voltagem aplicada, conforme a necessidade do experimento. (figura 19).

E por fim, acoplado na parte da frente do semicírculo e no envoltório de alumínio, um motor dará movimento as presas construídas (estímulos).

Figura 19 - Parte frontal da cúpula em que uma medição de temperatura é efetuada ao tentar esfriar o semicírculo. O termômetro digital infravermelho indica uma temperatura de 15.6°C do background.

Outro equipamento construído em nossos laboratórios (e oficinas) foi uma placa de metal (alumínio) onde a cabeça da cobra ficará presa ao efetuar o procedimento cirúrgico da mesma.

A placa consiste em um retângulo de 14x16cm, porém recortado como mostra à figura abaixo. Esta placa possui um triângulo de metal acoplado, onde a cabeça da cobra

ficará, e do lado, há uma haste que servirá para a fixação da cabeça da cobra ao efetuar a cirurgia. O equipamento também possui um micromanipulador acoplado, em que estará o eletrodo utilizado nos experimentos.

A cobra ficará presa através de fitas velcros também acoplados na placa (vide figura abaixo).

Figura 20 - Placa de metal que irá fixar a cabeça da cobra para a realização tanto do procedimento cirúrgico quanto do procedimento experimental.

A foto geral do sistema final pode ser observada abaixo:

Figura 21 - Foto geral só sistema montado em cima de uma bancada.

6.2.2 Estímulos:

Os estímulos construídos variam de acordo com o objetivo que queremos em cada tipo de experimento. Como dito na seção anterior, temos um motor acoplado no envoltório de alumínio que consegue girar até 180° , ou seja, gira numa linha horizontal ao longo da cúpula construída como background. Nesse motor poderão ser acoplados diferentes estímulos, presos a um braço, rotacionado pelo motor na frente do background. Este braço é feito de alumínio e pintado de tinta preta fosca, igualmente ao background. Cada estímulo “acoplado” ao braço tem um espaguete termo retrátil que serve para esconder os fios deste estímulo que serão levados até uma fonte com voltagem regulável.

Construímos dois tipos de estímulo, o primeiro é uma resistência circular de aproximadamente 1,4cm de diâmetro, acoplada no meio do braço, que também foi pintada

de preta. Essa resistência será aquecida em diversas temperaturas, de acordo com o experimento efetuado.

Outro tipo de experimento que será realizado com essa resistência é verificar se a cobra “enxerga” a temperaturas menores que sua temperatura corporal, e para isso, iremos adicionar um Spray congelante aerosol (IMPLASTEC congelador de circuitos) para resfriar essas resistências, visto que não conseguimos temperaturas mais baixas que a temperatura ambiente.

Figura 22 - Foto do estímulo. Resistência circular acoplada no meio de arco de alumínio, dentro da cúpula de cobre (Todos devidamente pintados com tinta fosca preta).

Para sabermos exatamente a temperatura do estímulo, utilizamos uma resistência (NTC) com coeficiente de temperatura negativo, ou seja, a resistência diminui com o aumento da temperatura. Desta forma, medindo sua resistência podemos determinar sua temperatura. Para tanto construímos um gráfico colocando a resistência (NTC) num béquer com água e medindo sua resistência com o ohmímetro. (gráfico 1)

Gráfico 1 - Gráfico da resistência sendo esquentada a uma amperagem equivalente à 150mA ($V=0,9V$).

Outro estímulo criado foi bem simples, somente uma placa peltier acoplada em um braço mecânico (figura 23) que variava da direita para a esquerda em 3 diferentes frequências (velocidades). A placa peltier mudava de temperatura à medida que aumentávamos a amperagem da mesma. Com esse estímulo criado, fizemos experimentos variando tanto a temperatura quanto a frequência de movimento do estímulo. (figura 24)

Figura 23 - Placa peltier acoplada no braço mecânico sendo mostrada através da câmera térmica (Flir SC640).

Figura 24 - Experimento sendo realizado com o braço mecânico e placa peltier.

6.3 Dispositivo para controle de velocidades e ciclos dos estímulos

Foi construído um dispositivo para mudar o ângulo da varredura e velocidade dos estímulos criados. Com esse dispositivo, conseguimos alertar arbitrariamente as velocidades nos experimentos, ou seja, lentas ou rápidas. Podemos também deixar o estímulo parado, sem movimento algum em qualquer posição, ou movimentá-los em ciclos, ou seja, podemos fazer um movimento direto, de ida e volta, ou um movimento em que o estímulo vai, permanece fixo por alguns segundos e então volta, caracterizando assim ciclos não contínuos.

Isso tudo é feito utilizando o circuito apresentado abaixo:

Figura 25 - Figura que mostra o funcionamento do movimento do estímulo.

A figura acima representa as entradas e saídas do circuito apresentado abaixo. Temos dois geradores, um sendo um gerador de onda triangular fixa, e outra um gerador de onda triangular variável; tendo como saída um pulso de largura variável.

Figura 26 - Circuito que caracteriza o movimento do estímulo.

O amplificador operacional (indicado pelo quadrado azul) possui duas entradas, umas delas provêm de um gerador de onda triangular, de período variável (2s a 80s) que é responsável pela amplitude desta onda, e outra de uma tensão pré-selecionada por um potenciômetro, que irá gerar a posição do estímulo. A tensão de saída deste amplificador servirá como tensão de entrada para o comparador (indicado pelo quadrado verde), que irá comparar este sinal com a entrada do gerador de onda triangular fixa para gerar um pulso de largura variável a ser fornecido ao motor.

Portanto, para mudar a largura do pulso do sinal de saída (posição do estímulo) é só mudar o sinal de referência, deixando a largura mais estreita (1ms) ou mais larga (2ms).

A foto deste circuito construído e montado dentro de uma caixa:

Figura 27 - Dispositivo que controla o movimento do estímulo. Legenda dos botões: 1-Velocidade do movimento (normal ou lenta), 2-Centro do movimento, 3-Amplitude do movimento, 4-Variação do estímulo (botão centralizado caracteriza o estímulo parado, botão virado para o lado esquerdo caracteriza estímulo parado na esquerda e do lado direito caracteriza estímulo parado na direita, em determinada variação de ciclo), 5-Variações do ciclo (botão centralizado caracteriza o estímulo parado, botão virado para o lado esquerdo caracteriza ciclo direto e do lado direito caracteriza ciclo variável), 6-Sinal do motor, 7-Amplitude do sinal para gravação, 8-Velocidade de deslocamento (botão para cima caracteriza rápido e para baixo caracteriza lento).

Outro dispositivo construído no intuito de saber em que temperatura está o estímulo (no caso a resistência) em determinado momento do experimento, é um circuito que chaveia esse componente. O circuito (figura 28) é composto de um relê que é ligado tanto a uma fonte, quanto à resistência NTC. Portanto ao apertar um botão, esse relê é chaveado, medindo a voltagem do estímulo. Como esse dispositivo está ligado a um ohmímetro, temos imediatamente o valor da resistência no momento em que apertamos o botão e assim, com a ajuda do gráfico feito anteriormente (gráfico 1), sabemos o valor de temperatura em que se encontra o estímulo. Podemos comparar essa temperatura obtida com a temperatura dada tanto pela câmera térmica, quanto pelo termômetro digital infravermelho em forma de uma pistola (Minipa MT-330).

Figura 28 - Circuito de chaveamento introduzido para viabilizar a medição da resistência (R) permitindo determinar a temperatura do estímulo.

7 COLETA E ANÁLISE DOS DADOS

Após efetuada a cirurgia, o eletrodo será inserido no teto óptico para a captação do sinal. A profundidade de penetração do eletrodo será de difícil determinação, pois a cada inserção no cérebro, o mesmo sofre uma depressão. O eletrodo de tungstênio (FHC) utilizado possui uma impedância de 500k Ω . Nos experimentos, gravaremos (extracelularmente) o lado esquerdo do cérebro da cobra (teto óptico), o que corresponde a mostrar o estímulo do lado direito. A temperatura ambiente será mantida constante a 22°C e a cobra estará com os olhos tapados por fita adesiva preta.

Os dados registrados (sinal neural, sinal do período do motor, temperatura da presa e temperatura do background) serão de cerca de alguns minutos para cada experimento, dependendo do que se quer analisar, mudando a temperatura do background em relação ao estímulo, e a distância do estímulo em relação à cobra. O sinal neural e o sinal do período do motor serão coletados através da placa de som e as temperaturas através da câmera térmica. Além disso, seremos capazes de mudar a frequência do movimento do estímulo, para assim mudar sua velocidade.

O sistema utilizado para a captação do sinal é constituído de um Amplificador AC (DAM 80) diferencial para o microeletrodo, possuindo um ganho de 10000, e dois filtros, um passa alta de 10KHz e um passa baixa de 300Hz, e de um pré-amplificador. O filtro passa alta vai cortar todas as frequências baixas que são prejudiciais para a captação do sinal e somente deixar passar as frequências superiores à frequência de corte, e o passa baixa apenas as frequências que interessam, ou seja, permite a passagem de frequências baixas atenuando a amplitude das frequências maiores do que a frequência de corte. Essa filtragem efetuada pelo amplificador serve para diminuir o ruído do sinal captado, seja pela radiação eletromagnética ou pelo próprio sistema de captação do sinal biológico. Ligado a saída do amplificador temos as caixas de áudio monitorando o sinal captado, sendo um aliado na detecção do sinal permitindo manter a visão focada na incisão dos eletrodos.

A aquisição dos dados será feita através de uma placa de som de um computador, em ambiente Windows Xp. As placas de som possuem duas entradas, uma delas terá o sinal do motor como entrada e a outra o sinal captado do teto óptico (spikes). A resolução do dado capturado e reproduzido pela placa de som é definida pelo número de bits, neste caso 16

bits e a taxa de amostragem do sinal coletado será de 24KHZ. Essa taxa é importante, pois ela é a quantidade de pontos por segundo que o sinal é capturado ou reproduzido pela placa de som e, quanto maior for a taxa de amostragem, maior será a fidelidade da representação do sinal coletado, mas também produzirá arquivos de dados maiores.

Já a análise dos dados será realizada com os softwares MATLAB, GNU Octave e GNU Plot, para assim calcular as séries de tempo e *plotar* os gráficos. Os dados foram capturados através do software FreeVIEW-Sound-PRO v1.3.

Para a análise das fotos do estímulo adquiridos através de uma câmera térmica (Flir SC64, capturando 10 quadros/seg), iremos utilizar o programa ThermoCAM Researcher 2.10, que nos fornece a foto tirada com todas as informações de temperatura do ambiente, obtendo assim detalhadamente, todos os valores de temperatura do ambiente pois a cada 1 segundo, 10 fotos são tiradas do experimento, conseguindo produzir uma sequência de imagens do experimento completo.

8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir é exibido o sinal de resposta da cobra (azul) quando um estímulo desloca-se à sua frente. Porém é exposto somente um determinado instante de tempo, levando em consideração que o arquivo é longo e não tendo a necessidade de mostrá-lo por completo. Juntamente com o sinal, há o sinal de sincronismo fornecido pelo gerador de deslocamento do estímulo indicando a ida ou a volta (verde). Podemos observar que os spikes estão respondendo ao estímulo, ou seja, quando o estímulo passa na frente da cobra, ela responde com potenciais de ação.

Gráfico 2 - Parte do sinal (azul) e estímulo (verde).

Nos quatro primeiros experimentos, que seguem abaixo, queríamos explorar a resposta da cobra em relação à velocidade de deslocamento de um estímulo. Para isso, tanto o estímulo quanto o background foram colocados a temperaturas constantes (45°C e 10.9°C respectivamente) durante o decorrer de todo o experimento. Esses extremos de temperatura serviram para dar um contraste maior no ambiente construído para a cobra e assim, verificar o que ocorre quando a velocidade do estímulo é alterada. Todos os experimentos foram coletados em um período de 2 minutos, a temperatura da cobra é de 23°C e a distância entre

a cobra e a presa é de 10cm.

- **Experimento 1: Período: 1,7s**

O gráfico abaixo, chamado de raster plot, mostra os potenciais de ação (spikes) como resposta da cobra em relação a um ciclo do estímulo, ou seja, cada linha do eixo y do gráfico corresponde a uma ida e volta do estímulo. Percebemos que há resposta da cobra em relação a essa velocidade do estímulo e que permanece relativamente constante ao longo do experimento, produzindo uma quantidade grande de spikes.

Gráfico 3 - Raster plot do experimento 1.

Percebemos que na parte direita do gráfico há uma quantidade maior de potenciais de ação registrados, isto se deve ao fato de que a simetria do estímulo (tempo de ida e volta) era diferente, em que o tempo de volta era superior ao de ida.

Gráfico 4 - Sinal do estímulo referente ao experimento 1. Ida possui um tempo de 0,78s, e a volta de 0,90s, totalizando uma diferença de 0,12s.

Para uma melhor visualização da quantidade de spikes, construímos um histograma, referente à contagem dos potenciais de ação em cada janela de tempo (aproximadamente 5ms), ou seja, cada coluna do gráfico representa o número total de spikes nesta janela (em segundos). Percebemos que deve haver um “ângulo ótimo” em relação ao estímulo passando em frente à fosseta que gera uma maior resposta (picos do gráfico) da cobra ao estímulo apresentado.

Gráfico 5 - Histograma: quantidade máxima de spikes, do experimento 1.

O gráfico a seguir representa a regularidade dos disparos por período, ou seja, somamos a quantidade de spikes relacionados a um período completo (e não ao mesmo instante de tempo).

Os disparos estão bem distribuídos, como concluímos anteriormente sobre a resposta permanecer constante ao longo do experimento, e a média dos disparos é cerca de 100 disparos por período.

Gráfico 6 - Disparos por período, do experimento 1.

- **Experimento 2: Período: 2,23s**

O segundo experimento foi realizado com uma diminuição da velocidade do estímulo. Podemos observar neste experimento que a cobra dispara menos spikes do que no experimento 1 (período 1,7s). Essa diferença deve ser devido ao fato de que o período para este experimento é maior do que o período do experimento 1. (1,7s)

Gráfico 7 - Raster plot do experimento 2.

Novamente na parte direita do gráfico temos uma quantidade maior de spikes devido ao tempo do estímulo ser diferente:

Gráfico 8 - Sinal do estímulo do experimento 2. Diferenciando a ida e volta por 0,15s.

No histograma, a contagem dos spikes (em um instante) diminuiu comparada com uma velocidade mais rápida (experimento 1 – 1,7s).

Gráfico 9 - Histograma do experimento 2.

Observamos que os disparos por período para este experimento é mais regular e a cobra dispara uma quantidade de spikes por período maior quando comparada com uma velocidade mais rápida (média de 130 disparos por ciclo).

Gráfico 10 - Disparos por período do experimento 2.

- **Experimento 3: Período: 3,8s**

O terceiro experimento possui uma velocidade menor do que os experimentos anteriores. Percebemos facilmente pelo raster plot, que há uma diminuição na resposta da cobra para esta velocidade e uma dispersão um pouco maior, ou seja, estamos diminuindo a velocidade do estímulo e com isso, diminuindo também a resposta da cobra.

Gráfico 11 - Raster plot do experimento 3.

O gráfico abaixo mostra o sinal do estímulo, evidenciando a diferença do tempo de ida e volta, criando uma quantidade maior de spikes em um dos movimentos:

Gráfico 12 - Sinal do estímulo do experimento 3. Diferenciando a ida e volta de 0,27s.

O histograma para este experimento mostra que a soma dos potenciais de ação vai decaindo, à medida que diminuimos a velocidade (comparada ao experimento 1 -1,7s- e experimento 2 -2,23s).

Gráfico 13 - Histograma do experimento 3.

Percemos pelo gráfico abaixo, a regularidade dos disparos por período, e que, aumenta à medida que a velocidade do estímulo diminui, porém com uma dispersão maior, totalizando uma quantidade menor em relação ao experimento todo, devido à diminuição da velocidade. A média de disparos por ciclos para esse experimento é cerca de 150.

Gráfico 14 - Disparos por período do experimento 3.

- **Experimento 4: Período: 8,6s**

E por fim, a velocidade do estímulo para este último experimento foi a mais lenta. Observamos uma quantidade inferior da resposta da cobra a essa velocidade e verificamos que os potenciais de ação estão bastante dispersos.

Gráfico 15 - Raster plot do experimento 4.

Apesar da dispersão na quantidade de spikes, ainda podemos perceber a diferença entre o tempo de ida e volta do estímulo, causando uma quantidade maior na parte direita do gráfico do raster plot.

Gráfico 16 - Sinal do estímulo referente ao experimento 4. Diferenciando a ida da volta por 0,60s.

O histograma mostra que, a quantidade da soma dos spikes em um mesmo instante, é muito baixa, devido ao fato do estímulo estar a uma velocidade de quase 10s por período. Esta quantidade quase iguala-se durante o experimento todo.

Gráfico 17 - Histograma do experimento 4.

Porém no gráfico abaixo, apesar de verificarmos uma regularidade de spikes por período, há uma quantidade muito menor de spikes ao longo de todo o experimento, e a média de disparos por ciclo é de 225.

Gráfico 18 - Disparos por período do experimento 4.

Com as velocidades variadas, criamos um gráfico relacionando a atividade neural com as velocidades. Porém como há a assimetria do deslocamento do estímulo, esse gráfico foi construído pela quantidade dos potenciais de ação para cada período (pois difere da ida e volta) em função da sua respectiva velocidade, calculada através do ângulo de varredura do estímulo (75° ida e 75° volta) pelo tempo do período.

Tabela 1 - Potenciais de ação e respectivas velocidades para o deslocamento de ida e de volta do estímulo.

Spikes/segundo (ida)	Velocidade angular (ida)	Spikes/segundo (volta)	Velocidade angular (volta)
25,58	96,15	30,14	83,33
25,16	72,12	29,62	63,03
16,31	42,13	19,27	36,59
11,85	18,56	11,18	16,16

Podemos observar que à medida que a velocidade aumenta, há o aumento dos potenciais de ação e vemos que a quantidade é maior, já verificada pelos gráficos raster plot construídos, que mostram uma quantidade maior de spikes no período de volta devido à assimetria.

Gráfico 19 - Atividade neural em função da velocidade do estímulo.

Apesar da diferença no período de ida e volta devido à assimetria, os gráficos da atividade neural se comportam da mesma maneira, aumentando os potenciais de ação à medida que a velocidade aumenta.

- **Experimento 5:**

Devido aos resultados obtidos nos experimentos anteriores, este próximo experimento serviu para examinar qual a taxa de disparo da resposta da cobra, ou seja, ao colocarmos o estímulo à frente dela (fosseta) sem movimento algum, qual seria a resposta devido a esta situação. Para isso mantivemos as temperaturas do estímulo e background as mesmas dos experimentos anteriores (45°C e 10.9°C respectivamente), e gravamos a resposta da cobra referente ao estímulo parado na frente da fosseta. Esta gravação foi registrada durante 2 minutos. Podemos verificar pelo raster plot que a cobra não percebe a presença do estímulo à sua frente. Os potenciais de ação estão completamente dispersos ao longo do experimento, ou seja, há pouquíssimos spikes sendo disparados.

Gráfico 20 - Raster plot do experimento 5.

O histograma da contagem dos spikes para cada instante iguala-se no experimento todo, ou seja, como o estímulo está parado (não há velocidade), a sua taxa de disparo é mínima, sendo considerado como disparos espontâneos da cobra.

Gráfico 21 - Histograma do experimento 5.

Pela soma da quantidade de spikes em um ciclo (ida e volta), observamos que não há

regularidade nenhuma, e que além de pouquíssimos spikes, eles estão dispersos em relação ao tempo em que o estímulo se encontra parado.

Gráfico 22 - Disparos do experimento 5.

Os próximos três experimentos serviram para verificar qual a resposta da cobra quando uma variação de contraste entre estímulo e background é apresentada a ela. Mativemos a velocidade do estímulo igual para esses experimentos, em que o período vale 2.07s.

- **Experimento 6:**

Período: 2,07s

Temperatura da presa: variando de 11°C até 27°C.

Temperatura do background: 12.1°C.

Temperatura da cobra: 23°C.

No experimento seis, a temperatura do background era de 12.1°C e o estímulo começou com uma temperatura de 11°C (devido à ajuda do spray congelante adicionado a ele) e foi aquecido até chegar a uma temperatura de 27°C. Os dados foram coletados durante 10 minutos.

O raster plot mostra essa transição de temperatura ao longo do experimento.

Podemos observar que no começo do experimento, há uma pequena concentração de spikes no meio e nos extremos do período, indicando que o estímulo estava um pouco mais frio que o background, e assim a cobra tinha a percepção invertida da situação, ou seja, o estímulo que estava mais frio seria o background e o background seria o estímulo. Quando a temperatura do estímulo aumenta, tendo um contraste maior em relação ao background, a cobra apresenta uma maior quantidade de spikes e menos dispersos, e se concentrando em uma porção do gráfico (ciclos entre 200 e 300).

Gráfico 23 - Raster plot do experimento 6 (No ciclo 0 a presa está a uma temperatura de 11°C atingindo um máximo de temperatura de 27°C no ciclo 300).

O histograma mostra que na porção em que há um aumento na temperatura do estímulo, há um máximo de spikes, sugerindo que o estímulo passa em uma posição, à frente da fosseta, em que a cobra o percebe mais facilmente (picos do gráfico).

Gráfico 24 - Histograma do experimento 6.

A quantidade de disparos por período mostra claramente que quando o estímulo está mais quente, há uma excitação muito maior dos spikes (verificada ao final do gráfico, entre os ciclos 200 a 300), ou seja, ao aumentar a temperatura, a resposta da cobra vai aumentando também – quanto mais quente estímulo, maior o contraste com o background e maior a percepção da cobra a esta diferença.

Gráfico 25 - Disparos período do experimento 6.

- **Experimento 7:**

Período: 2,07s

Temperatura da presa: variando de -34.6°C até 27°C .

Temperatura do background: 12.7°C .

Temperatura da cobra: 23°C .

O experimento sete seguiu à ideia do experimento anterior, porém no experimento seis, estávamos só verificando a ideia, e as transições de temperatura não foram anotadas (no caso, gravadas com a câmera térmica). Portanto este experimento foi feito para aperfeiçoar a análise do experimento anterior além de ter uma variação maior nos extremos de temperaturas. Os dados foram coletados durante 20 minutos. Para o background foi adotada uma temperatura ligeiramente maior que no experimento anterior, sendo 12.7°C e com o estímulo variando em temperaturas maiores, de -34.6°C a 27°C . Observamos que há, como visto anteriormente, uma quantidade maior de spikes à medida que o contraste entre estímulo e background aumenta. Isto pode ser verificado na porção final do gráfico, em que temos uma maior quantidade de potenciais de ação além de um agrupamento dessa quantidade. No começo do experimento quando o estímulo está com uma temperatura muito menor do que o background (contraste de -47.6°C), podemos observar que há spikes, e que parece que a cobra inverte a situação, ou seja, como o background está mais quente que o estímulo, ela considera o background como sendo o estímulo - movimentando-se à frente dela. No entanto, podemos observar também que mesmo o estímulo estando a uma temperatura menor que o background (contraste de 5.7°C), a cobra emite resposta; havendo assim uma quantidade considerável de spikes. A barra de temperatura ao lado do gráfico mostra a diferença de temperatura entre estímulo e background. Podemos observar que perto do ciclo 400, há uma diferença brusca na quantidade de spikes, e que isto pode ter ocorrido devido ao movimento do eletrodo dentro do teto óptico da cobra.

Tabela 2 - Temperaturas utilizadas para a realização dos experimentos.

Temperatura do background (°C)	Temperatura do estímulo (°C)	Variação de temperatura (°C)
13	-34,6	-47,6
12,9	9,1	-3,8
12,8	16,3	-3,5
12,7	18,4	5,7
12,7	20,1	7,4
12,6	24	11,4
12,6	26,2	13,6

Gráfico 26 - Raster plot do experimento 7.

A quantidade de spikes aumenta neste experimento em cada instante, provavelmente devido ao fato de que o contraste de temperatura é maior, excitando os spikes e obtendo uma resposta melhor. Também observamos picos máximos de spikes em determinado instante em que o estímulo passa na frente da fosseta.

Gráfico 27 - Histograma do experimento 7.

A quantidade de disparos por período mostra a transição de temperatura observada anteriormente, em que temos uma quantidade maior de potenciais de ação ao final do gráfico, o que corresponde a uma diferença de contraste maior entre estímulo e background. O mesmo ocorre no começo no gráfico, em que a cobra emite uma resposta devido ao fato do background estar com uma temperatura maior que estímulo, em que assim ela considera o background como se fosse o estímulo, e, portanto o estímulo estaria parado e o background se movimentando.

Gráfico 28 - Disparos por período do experimento 7.

- **Experimento 8:**

Período: 2,07s

Temperatura da presa: variando de 5°C até 38°C.

Temperatura do background: 26.6°C.

Temperatura da cobra: 23°C.

O experimento oito foi realizado no âmbito de refinar todos os dados obtidos pelo experimento seis e sete, e aumentando o contraste entre background e temperatura para verificar se realmente a cobra emite resposta quando o estímulo está à uma temperatura baixa e menor que sua temperatura corporal. Para isso, o background estava com uma temperatura de 26.6°C, porém o estímulo variou com uma temperatura de 5°C a 38°C. Os dados foram coletados durante 25 minutos. Percebemos como anteriormente, uma quantidade grande de potenciais de ação, tanto no começo do experimento como no final. Como já analisado, no começo do experimento há essa quantidade grande devido ao fato de que a cobra considera a condição estímulo/background invertidos, já que o background está mais quente que o estímulo. No final do experimento, em que o estímulo está mais quente que o background, há também uma quantidade grande de spikes disparados. Porém, observamos que a porção central do gráfico (entre os ciclos 300 e 400) apresenta uma quantidade de spikes considerável, e pela barra de temperatura ao lado do gráfico, observamos que a diferença de contraste entre background/estímulo é próxima de zero, ou seja, mesmo o estímulo estando a temperaturas baixas, ela percebe o estímulo e responde à ele.

Tabela 3 - Temperaturas utilizadas para a realização dos experimentos

Temperatura do background (°C)	Temperatura do estímulo (°C)	Variação de temperatura (°C)
25	5,4	-19,6
26,4	19,9	-6,5
28,1	22,9	-5,2
29,3	25,8	-3,5
29,5	28,4	-1,1
29,8	30,5	0,7
30,2	31,3	1,1
30,5	35,8	5,3

Gráfico 29 - Raster plot do experimento 8.

A soma dos spikes em um instante para este experimento é ainda maior (em relação ao experimento anterior), devido ao contraste.

Gráfico 30 - Histograma do experimento 8.

A soma dos potenciais de ação para cada período mostra claramente a resposta da cobra para temperaturas em que o contraste entre background/estímulo é alta (sendo o estímulo mais quente ou mais frio que o background) – verificada no começo (ciclos entre 0 e 100) e final do gráfico (ciclos entre 500 e 600).

Gráfico 31 - Disparos por período do experimento 8.

O problema de simetria foi posteriormente corrigido, e novos gráficos variando a velocidade foram efetuados. Temos abaixo um dos experimentos refeitos com um período de 3,43s. O background estava a uma temperatura de 12°C e o estímulo de 40°C.

- **Experimento 9:**

Período: 3,43s

Temperatura da presa: 40°C.

Temperatura do background: 12°C.

O raster plot mostra os potenciais de ação (spikes) como resposta da cobra em relação ao período do estímulo. Percebemos a resposta da cobra em relação a essa velocidade do estímulo e que há uma quantidade grande de spikes disparados.

Gráfico 32 - Raster plot do experimento 9.

O histograma representa a contagem dos spikes em determinado tempo, e além de observamos uma quantidade grande de spikes, observamos uma região bem definida (picos do gráfico) na região central, evidenciando que há um ângulo “ótimo”, gerando essa contagem de spikes superior.

Gráfico 33 - Histograma do experimento 9.

Percebemos no gráfico abaixo a dispersão dos disparos por período (ciclo), com uma média de 402 spikes por ciclo.

Gráfico 34 - Disparos por período do experimento 9.

Com a simetria corrigida, várias outros experimentos com velocidades variadas foram realizados, e o gráfico de velocidade foi construído, porém o ângulo de varredura para estes experimentos foi de 130° .

Tabela 4 - Potenciais de ação e respectivas velocidades.

Spikes/segundo	Velocidade angular
80,85	25,29
81,29	25,42
97,72	31,08
101,85	40,51
110,12	55,84
117,62	76,01
137,86	120,20
187,47	301,24

Podemos observar que à medida que a velocidade aumenta, há o aumento dos potenciais de ação. A taxa de disparo (spikes/s) pode variar bastante quando exposto ao mesmo estímulo e pode depender da cobra e da posição do eletrodo inserido no teto óptico.

Gráfico 35 - Atividade neural em função da velocidade do estímulo.

9 CONCLUSÃO

Os dispositivos construídos para o estudo do sistema sensorial infravermelho da cobra foram adequados. Conseguimos, com todo o set-up experimental, obter respostas relativas à percepção infravermelha da cobra em função da velocidade, temperatura e contraste entre background e estímulo.

Os dispositivos criados tinham como objetivo servir de apoio para um estudo do sistema infravermelho, criando um ambiente infravermelho controlável para a cobra. Para este estudo, as medições da resposta da cobra foram efetuadas diretamente no teto óptico da serpente.

Obtivemos como resultados, resposta da cobra a esse ambiente criado e conseguimos observar que a resposta aumenta à medida que o contraste entre background e estímulo aumenta.

Podemos observar também que a medida que a velocidade do estímulo, que passa à frente da cobra, diminui, sua resposta também diminui, tendo assim menos disparos.

Verificamos que quando o estímulo está parado na frente na cobra, sem movimento algum, a cobra exibe uma resposta dispersa, com poucos spikes, podendo ser considerado spikes espontâneos do sistema sensorial infravermelho, ou seja, além do contraste ser importante para a serpente, o movimento é essencial para a percepção dela, podendo ajudá-la na caça de presas ou para fugir de potenciais predadores.

Ao analisar a transição de temperatura, fica claro novamente que o contraste é necessário, já que verificou-se que quanto maior o contraste, mais potenciais de ação ela exibe. Fica claro também a inversão de papéis que a cobra realiza quando o background está a uma temperatura maior que o estímulo, pois neste caso ela considera o estímulo sendo o background e vice-versa, supondo assim que o que está se movimento é o background e o estímulo está parado. Podemos observar também que quando o contraste entre estímulo e background era baixo (temperatura dos dois próximos) só há spikes espontâneos, como se estivesse enxergando um ambiente só. No entanto, o que chamou atenção neste tipo de experimento realizado foi de que tanto estímulo quanto background com temperaturas baixas (menores do que a temperatura corporal da cobra) proporcionaram uma resposta da cobra, resultado este não exibido nos estudos do sistema sensorial infravermelho das cobras

realizados e publicados na literatura.

Portanto, toda a instrumentação construída para servir de teste como estudo do sistema infravermelho em serpentes não só foi muito bem realizada, obtendo respostas relativas ao contraste e movimento do estímulo, como também gerou resultados interessantes (resposta da cobra para estímulos com temperaturas menores do que sua temperatura corporal) que servirão de indagações futuras.

Os equipamentos e técnicas de medidas descritas e utilizadas neste trabalho poderão servir para futuras pesquisas visando determinar a sensibilidade do sistema óptico infravermelho da cobra em função da velocidade, gradiente de temperatura e uniformidade do background, além de ser possível testar também várias cobras variando espécies e idades.

REFERÊNCIAS

- 1 CAMPBELL, A. L. et al. Biological infrared imaging and sensing. **Micron**, v. 33, n. 2, p. 211-225, 2002.

- 2 GORIS, R.C.; TERASHIMA, S. The structure and function of the infrared receptors of snakes. **Progress in Brain Research**, v. 43, p. 159-170, 1976.

- 3 CHANGJONG M.; TERASHIMA, S. Response of the infrared receptors of a crotaline snake to ethanol. **Neuroscience Letters**, v. 334, n. 1, p. 29-32, 2002.

- 4 GORIS, R. C.; TERASHIMA, S. Central response to infrared stimulation of the pit receptors in a crotaline snake, *trimeresurus flavoridis*. **Journal of Experimental Biology**, v. 58, p. 59-76, 1973. Disponível em: < <http://jeb.biologists.org/content/58/1/59.full.pdf>>. Acesso em: 22 abr. 2013.

- 5 GORIS, R. C. Infrared organs of snakes: an integral part of vision. **Journal of Herpetology**, v. 45, n. 1, p. 2-14, 2011. Disponível em: < <http://www.bioone.org/doi/pdf/10.1670/10-238.1>>. Acesso em: 22 abr. 2013.

- 6 GORIS, R. C. et al. Blood flow in snakes infrared organs: response-induced changes in individual vessels. **Microcirculation**, v. 14, n. 2, p. 99-110, 2007.

- 7 MOLENAAR, G. J. Anatomy and physiology of the infrared sensitivity of snakes. In: GANS, C.; ULINSKI, P. S. (Eds.) **Sensorimotor Integration**. Chicago: Chicago University Press, 1992. cap. 5. (Biology of the Reptilia, v. 17, neurology c).

- 8 EBERT, J. **Infrared sense in snakes** – behavioural and anatomical examinations (*Crotalus atrox*, *Python regius*, *Corallus hortulanus*). 2007. 108 p. Dissertation (Doctor rerum naturalium). Disponível em: < <http://hss.ulb.uni-bonn.de/2008/1318/1318.pdf>>. Acesso em: 23 abr. 2013.

9 NEWMAN, E.A; HARTLINE, P.H. The infrared vision of snakes. **Scientific American**, v. 246, n. 3, p. 116-123, 1982. DOI:10.1038/scientificamerican0382-116.

10 FANG, J. Snake infrared detection unravelled. **Nature**. 2010. DOI:10.1038/news.2010.122. Disponível em: < <http://www.nature.com/news/2010/100314/full/news.2010.122.html> >. Acesso em: 23 abr. 2013.

11 BULLOCK, T.H.; FOX, W. The anatomy of the infra-red sense organ in the facial pit of pit vipers. **Quarterly Journal of Microscopical Science**, v. 98, n. 2, p. 219-34, June 1957.

12 SICHERT, A.B.; FRIEDEL, P.; HEMMEN, J.L. A snake's perspective on heat: reconstruction of input using an imperfect detection system. **Physical Review Letters**, v. 97, n. 6, p. 068105, 2006.

13 LEON, M. Rattlesnake: viperidae family crotalus and sistrulus. **Herpetology**. 2007. Disponível em: < <http://www.catskillmountaineer.com/pdf/Timber-Rattlesnake-USF.pdf> >. Acesso em: 23 abr. 2013.

14 PANZANO, V. C.; KYEONGJIN, K.; GARRITY, P. A. Organ infrared snake eyes: TRPA1 and the thermal sensitivity of the snake pit. **Science Signaling**, v. 3, n. 127, p. pe22. 2010. DOI: 10.1126/scisignal.3127pe22.

15 CHANGJONG, M. Infrared-sensitive pit organ and trigeminal ganglion in the crotaline snakes. **Anatomy & Cell Biology**, v. 44. n. 1, p. 8-13, 2011.

16 GORIS, R, et al. Nervous control of blood flow microkinetics in the infrared organs of pit vipers. **Autonomic Neuroscience: basic & clinical**, v. 84, n. 1-2, p. 98-106, 2000.

17 EBERT, J.; WESTHOOF, G. Behavioral examination of the infrared sensitivity of rattlesnake (*Crotalus atrox*). **Journal of Comparative Physiology A**, v. 192, n. 9, p. 941-947, 2006.

18 GRACHEVA, O. E. et al. Molecular basis of infrared detection by snakes. **Nature**, v. 464, p. 1006-1011, 2010. DOI:10.1038/nature08943.

19 GORIS, R. C.; NOMOTO, M. Infrared reception in oriental crotaline snakes. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v 23, n. 3, p. 879-892, 1967.

20 DYKE, J. U. V.; GRACE, M.S. The role of thermal contrast in infrared-based defensive targeting by the cooperhead, *Agkistrodon contortrix*. **Animal Behaviour**, v. 79, n. 5, p. 993-999, 2010.

21 TERASHIMA, S.; GORIS, R. C. Receptive area of an infrared tectal unit. **Brain Research**, v. 101, n. 1, p. 155-159, 1975

22 SAFER, A. B.; GRACE, M. S. Infrared imaging in vipers: differential responses of crotaline and viperine snakes to paired thermal targets. **Behavioural Brain Research**, v. 154, n. 1, p. 55-61, 2004.

23 KOHL, T. et al. Directional sensitivity in the thermal response of the facial pit in western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*). **The Journal of Experimental Biology**, v. 215, n. 15, p. 2630-2636, 2012.

24 HARTLINE, P.H.; BERSON, D.M. A. Tecto-rotundo-telencephalic pathway in the rattlesnake. **Journal of Neuroscience**, v. 8, n. 3, p. 1074-1088, 1988.

25 MOLENAAR, G. J.; FIZAAN-OOSTVEEN, J. L. F. P.; VAN DER ZALM, J. M. Infrared and tactile units in the sensory trigeminal system of python reticulatus. **Brain Research**, v. 170, n. 2, p. 372-376, 1979.

26 MOLENAAR, G.L. An additional trigeminal system in certain snakes possessing infrared receptors. **Brain Research**, v. 78, n. 2, p. 340-344, 1974.

27 EBERT, J.; WESTHOFF, G.; MORSCH, M. Infrared detection in the rattlesnake *Crotalus atrox* – from behavioural studies to midbrain recordings. 2006. Disponível em: <http://www.seh-herpetology.org/files/bonnensis/225_Westhoff.pdf>. Acesso em: 23 abr. 2013.

28 KROCHMAL, A R.; BAKKEN, G. S. The imaging properties and sensitivity of the facial pits of pitvipers as determined by optical and heat-transfer analysis. **The Journal of Experimental Biology**, v. 210, p. 2801-2810, 2007. DOI: 10.1242/jeb.006965.

29 JONES, B. S.; STONE, M. O.; LYNN, W. F. Thermal modeling of snake infrared reception: evidence for limited detection range. **Journal of Theoretical Biology**, v. 209, n. 2, p. 201-211, 2001.

30 BULLOCK, T.H.; DIECKE, F.P.J. Properties of an infrared receptor. **Journal of Physiology**, v. 134, n. 1, p. 47-87, 1956.

31 STANFORD, L. R., HARTLINE, P. H. Spatial sharpening by second-order trigeminal neurons in crotaline infrared system. **Brain Research**, v. 185, p. 115-123, 1980.

32 ESPECTRO eletromagnético. Disponível em: <
http://pt.wikipedia.org/wiki/Espectro_eletromagn%C3%A9tico>. Acesso em: 12 jun. 2013.

33 VISAO térmica. Disponível em: <
<http://theskinnyonscience.wordpress.com/2010/03/15/serpentine-night-vision/>>. Acesso em: 15 jun. 2013.

34 CASCAVEL. Disponível em: <<http://www.ufrjr.br/institutos/it/de/acidentes/peconha.htm>>. Acesso em: 15 jun. 2013.

35 FOSSETA da cascavel. Disponível em:
<<http://institutoalmaconsciente.wordpress.com/2013/03/04/toxina-de-veneno-de-cascavel-e-eficaz-contracancer-indica-estudo-do-butantan/>>. Acesso em: 15 jun. 2013.

36 VISAO térmica serpente. Disponível em: <
<http://www.newworldencyclopedia.org/entry/warm-blooded>>. Acesso em: 15 jun. 2013.