**Universidade de São Paulo
Instituto de Física de São Carlos**

Carolina Menezes Silvério

**A influência do voo na resposta do H1 e o registro
do comportamento motor em *Chrysomya
megacephala***

São Carlos
2013

Carolina Menezes Silvério

**A influência do voo na resposta do H1 e o registro
do comportamento motor em *Chrysomya
megacephala***

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

Área de Concentração: Física Aplicada

Opção: Física Biomolecular

Orientador: Reynaldo Daniel Pinto

Versão original

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)

Menezes Silvério, Carolina

A influência do voo na resposta do H1 e o registro do comportamento motor em *Chrysomya megacephala* / Carolina Menezes Silvério; orientador Reynaldo Daniel Pinto -- São Carlos, 2013.
81 p.

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

1. Sistema visual de moscas. 2. Neurônio H1. 3. Comportamento motor. 4. Influência do voo na resposta visual. 5. Neurobiofísica. I. Daniel Pinto, Reynaldo, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Carolina Menezes Silverio

Dissertação apresentada ao Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestra em Ciências.
Área de Concentração: Física Aplicada -
Opção Física Biomolecular.

Aprovado(a) em: 19/08/2013

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a). Reynaldo Daniel Pinto

Instituição: IFSC/USP

Prof(a). Dr(a). Guilherme Gomes

Instituição: UNESP/Rio Claro

Prof(a). Dr(a). Marcelo Bussotti Reyes

Instituição: UFABC/Santo André

Dedico este trabalho aos maiores amores da minha vida. Meus pais, Ana e Renato. Minha irmã, Carla. Meu namorado, Marcelo. E o meu príncipe, Mané.

Agradecimentos

Sem dúvida o meu maior agradecimento vai ao meu pai Renato e a minha mãe Ana por todo incentivo, compreensão, carinho, amor, paparicos, excessos durante toda minha vida e em especial, durante essa etapa da pós-graduação que estiveram me apoiando de todas as maneiras possíveis.

À minha irmãzinha Carla, que já não é mais aquela pequena pestinha companheira de todas horas, mas que continua sendo a minha melhor amiga. Sei que hoje estamos mais distantes mas amor de irmã nunca muda! E não se esqueça que sempre te amei imensamente.

Agradeço também ao meu namorado Marcelo pela paciência e carinho, aguentando minha ansiedade em todas as difíceis etapas que o mestrado exige, minha choradeira nos momentos de desespero, minha tagarelice nos momentos de empolgação e por me ouvir falar por horas só de moscas e mesmo assim me aguentar. Te amo.

Um agradecimento especial para minha amiga/confidente/psicóloga, Renata Batista pelo companheirismo e amizade de longa data, sete anos te aguentando não tem preço e espero que nunca tenha fim também. Passamos mais essa etapa juntas amiga mestra!

Ao meu grande amigo Rafael Viegas por ter tornado São Carlos mais alegre. Os dias que estive aqui foram os melhores e guardo com carinho as recordações das cantorias, confidências, cervejas e etc...

Aos amigos Jessica, Gisele, Rafinha, Matias, Quel, pela parceria nessa viagem doida que é a pós-graduação. Nossa união faz com que superemos qualquer tempo ruim !

Ao Prof. Dr. Reynaldo que confiou em uma aluna um pouco perdida entre a física e a biologia. Obrigada por todo carinho e auxílio, principalmente nessa fase de escrever a dissertação.

Aos amigos/técnicos/salvadores Lírio, Ivanilda, Ailton e Marquinho. Obrigada por tudo e sentirei muitas saudades.

Aos meus companheiros de moradia Dalcimar e Pedro. E às tantas outras pessoas que não citei o nome mas que fizeram parte da minha história no IFSC.

Agradeço também a todos os funcionários que me ajudaram nesses mais de dois anos: as moças da biblioteca, os rapazes da portaria, o pessoal da seção de pós-graduação, das finanças e principalmente, um imenso agradecimento ao Carlos Pereira da oficina mecânica por toda ajuda, você é o máximo.

Finalmente ao programa de Pós Graduação em Física Aplicada a Biomolecular do Instituto de Física de São Carlos.

Também à CAPES pela bolsa auxílio concedida e de grande ajuda para que eu pudesse me dedicar exclusivamente aos estudos e a elaboração da dissertação durante parte do Mestrado.

*“ Little fly,
Thy summer’s play
My thoughtless hand
Has brushed away.
Am not I
A fly like thee?
Or art not thou
A man like me? ”*

— WILLIAM BLAKE [1757-1827]

Resumo

SILVÉRIO, C. M. A influência do voo na resposta do H1 e o registro do comportamento motor em *Chrysomya megacephala*. 2013. 81 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

Desenvolvemos um protocolo experimental para estudar a codificação do movimento horizontal pelo neurônio H1 de moscas varejeiras *Chrysomya megacephala* durante o voo. Tradicionalmente, o neurônio H1 é considerado puramente sensorial, e a maioria dos trabalhos tem utilizado o trem de potenciais de ação deste neurônio para explorar o código neural visual da mosca enquanto esta se encontra imobilizada (cabeça, asas, patas) e observa passivamente uma imagem que se move de maneira controlada. Nosso laboratório já dispunha de um aparato para registrar de maneira adequada a atividade do H1, enquanto a mosca imobilizada observava um padrão de barras verticais se movendo de acordo com uma sequência de velocidades previamente escolhidas pelo experimentador. Por meio de um novo suporte, especialmente desenvolvido neste trabalho, pudemos obter as medidas eletrofisiológicas quando apenas parte do corpo do inseto se encontra fixo. Além disso, conseguimos encontrar uma maneira de estimular a mosca para que esta apresentasse períodos de atividade, com batimentos de asa, similares ao voo. Utilizamos estes períodos de atividade de voo para registrar a atividade dos músculos que controlam a direção do voo. Também utilizamos microfones que captam pequenas diferenças de pressão do batimento das asas para inferir quando a mosca quer mudar a direção do voo e validamos estas medidas com o auxílio de um pequeno acelerômetro adaptado à haste de fixação da mosca. Mostramos que a taxa média de disparo do H1 é mais alta quando a mosca está “voando” do que quando está com as asas paradas. Além disso, a resposta ao estímulo visual é mais rápida e mais intensa quando a mosca está voando. Estes resultados são evidências de que a codificação da informação visual é diferente nos dois casos. Nossos experimentos com registro da atividade de controle motor do voo através de microfones permitiram encontrar padrões que podem ser usados para inferir a tentativa do inseto de mudar a direção do voo, em um intervalo de poucas batidas de asas e de maneira não invasiva. Esta informação poderá ser utilizada no futuro para produzir um equipamento em que a própria mosca controle o movimento da imagem em tempo real.

Palavras-chave: Sistema visual de moscas. Neurônio H1. Comportamento motor. Influência do voo na resposta visual. Neurobiofísica.

Abstract

SILVÉRIO, C. M. The influence of flight in the H1's response and the record of motor behavior in *Chrysomya megacephala*. 2013. 81 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

We developed a protocol to address the movement information coding in flying *Chrysomya megacephala* by the horizontal sensitive H1 neuron. H1 is traditionally considered a purely sensory neuron and his sequence of action potentials is used to explore the visual neural code while an immobilized fly passively watch a movie generated by the experimenter. We improved an apparatus to perform such experiments, that was already working in our laboratory, by developing a new holder for the fly and electrode that allowed to record from H1 while only part of the fly was fixed, keeping wings and legs free to move. Moreover we found a protocol to stimulate the fly to present long periods of wing beating activity, very similar to the insect flying. During these flying periods of activity, we also recorded from the steering muscles that control fly direction as well as from small microphones sensitive to subtle pressure variations of the beating wings when the fly try to change direction. These recordings were validated by using an accelerometer adapted to the fly fixation rod. According to our results, the firing rate of H1 increases during the flying periods. Moreover, the response to visual stimuli is faster and more intense during the flying than the response when the wings are not beating. These are evidences that the information coding is different in both cases. We could also find some patterns in the time series of the microphones recordings that allowed us to infer, in a small number of wing beatings, when the insect tries to turn and what is the turning direction. This information can be useful to perform new experiments in the future, were the fly controls in real-time the image movement.

Keywords: Visual system of flies. H1 neuron. Motor behavior. Influence of flight on the visual response. Neurophysiology.

Lista de Figuras

Figura 2.1 - Fotos do aparato desenvolvido no IFSC pelo laboratório Dipteralab. a) Mosca está presa num tubo plástico colada com cera de dentista. O eletrodo de tungstênio e o fio de referência permitem capturar o sinal do H1. b) Mosca enxerga um estímulo visual constituído de barras verticais que se movem horizontalmente (27).	28
Figura 2.2 - A imagem percebida pela mosca é a combinação da informação recebida pelos vários omatídeos que compõem o olho composto do inseto. Cada omatídeos está orientado de tal maneira que recebe luz de um ponto diferente que o vizinho, toda a informação visual recebida pelos cerca de 10000 omatídeos vai passar pela lâmina, medula até chegar na placa lobular que contém várias dezenas de neurônios sensíveis a movimentos, o H1 é um deles.	29
Figura 2.3 - Conexões do H1 com seus vizinhos CH e HS. Devido à sinapse inibitória que ocorre entre o CH e o H1, pertencentes ao mesmo hemisfério, e a projeção do H1 no hemisfério contralateral excitando o HS e o CH, temos que a resposta do H1 é sempre inibida quando o outro H1 está ativo e vice versa.	30
Figura 2.4 - Neurônios presentes na placa lobular. Na foto a direita vemos o cérebro da mosca exposto, não é possível ver o neurônio H1 a olho nu mas tem-se uma ideia de sua arborização através da posição das traquéias encontradas no cérebro. Abaixo um sinal eletrofisiológico do H1, temos que um estímulo visual que excita e inibe o neurônio H1.	31
Figura 2.5 - Adaptado de (40). Dois distintos grupos de músculos são responsáveis pelo voo. Os músculos de força e direção exercem diferentes funções gerando força e agilidade durante o voo, respectivamente.	33
Figura 2.6 - Figura adaptada de (43). A) Os halteres batem em antifase com as asas, na base desses halteres existe uma matriz de receptores sensoriais que respondem a uma pressão mecânica ou deformação resultando em mudanças na batida desses halteres. B) Haltere pintado com solvente e pó de ferro (tirada em nosso laboratório).	34
Figura 2.7 - Fotos do aparato desenvolvido para medida do H1 e do comportamento locomotor.	35
Figura 2.8 - Micromanipuladores desenvolvido para captura do H1 do hemisfério direito com a mosca parcialmente solta.	36
Figura 2.9 - Foto do setup experimental. Pode-se ver a bancada do experimento com os monitores ligados e também o rack (a esquerda) com os equipamentos eletrônicos desenvolvidos para capturar o sinal.	37

Figura 2.10 - Diagrama em blocos do Front-End Analógico.	38
Figura 2.11 - Ciclo de vida da mosca-varejeira (nome científico <i>Chrysomia megacephala</i>)	39
Figura 2.12 - Aquário construído para armazenar as moscas com mais cuidado e permitindo um controle maior de temperatura e umidade.	40
Figura 2.13 - Foto mosca presa dorsalmente. A mosca bate as asas e patas livremente.	41
Figura 2.14 - Durante a cirurgia a quitina que reveste a parte traseira da cabeça da mosca é retirada para expor o cérebro. Um fio de prata agindo como terra é pendurado no canto direito da cabeça, parte inferior, em contato com a hemolinfa. Um eletrodo de tungstênio com impedância entre $3M\Omega$ a $5M\Omega$ é usado para achar o sinal do H1.	42
Figura 2.15 - Mosca posicionada entre dois microfones que registram o batimento acústico de cada asa. Um tubo de ar é colocado em frente a mosca para estimular o voo.	43
Figura 2.16 - A) Na figura inferior mostramos como varia a posição do estímulo visual no tempo para os experimentos do registro motor, o computador usará essas posições para controlar as barras verticais que se movimentam horizontalmente. Nesse caso vemos que o estímulo é simples e as barras vão varrer a tela indo para direita (reta crescente) e esquerda(decrescente). No topo apresentamos a velocidade desse estímulo, constante em módulo mas variando a direção a cada 0,8s. B) Posição do estímulo usado nos experimentos com o H1, o estímulo se repete a cada 2,5 com velocidade variando no tempo. No topo apresentamos um exemplo de como é a velocidade para uma única repetição do estímulo.	44
Figura 2.17 - Esse esquema mostra o aparato idealizado para medir a atividade do neurônio H1 enquanto a mosca apresenta atividade de voo registrada pelo microfone, acelerômetro e/ou registro dos potenciais de ação dos músculos de direção. O registro motor seria recebido pelo computador que através de um algoritmo em tempo real, controlaria o movimento da imagem apresentada. Dessa forma o H1 seria medido na condição em que inseto controlaria seu voo. Poderíamos investigar se a resposta do H1 nessas circunstâncias difere da resposta de quando o inseto não interfere no voo.	45
Figura 2.18 - Localizamos os músculos de direção Mb1 e Mb2. Dessa forma determinamos o local onde os eletrodos deverão ser inseridos para medida eletrofisiológica.	46
Figura 2.19 - Fios de prata implantados na região dos músculos Mb1 e Mb2.	47
Figura 2.20 - A) Medida extracelular obtida do Mb2. B) Temos o sinal de Mb1 com alta amplitude e alguns spikes menores que provavelmente são disparos do Mb2 (setas) que acabam capturados pelos eletrodos que estão medindo o Mb1 (essa interferência de um sinal na medida do outro denominamos cross-talking).	48

Figura 2.21 - Circuito dos microfones.	50
Figura 2.22 - Forças que atuam no voo da mosca.	51
Figura 2.23 - Foto extraída de (51). A mosca quando quer mudar sua direção de voo inclina mais uma asa do que a outra, essa diferença gera forças de arrasto assimétricas e produz uma aceleração para o lado que a mosca quer virar. Registramos essa aceleração utilizando a placa digidata.	52
Figura 2.24 - Diagrama com circuito eletrônico do acelerômetro e fotos do circuito acoplado à mosca.	53
Figura 2.25 - Picos encontrados num trecho filtrado do sinal extracelular do H1 na condição de voo e não-voo. As janelas coloridas representam as janelas que usamos para deslizar entre os picos detectados e calcular um limiar simples superior e inferior que vão definir se o pico é ou não um spike. Na figura inferior, vemos um caso em que foram detectados dois picos com características de spikes, porém temos um intervalo menor que o tempo refratário do neurônio de 2ms entre os dois. O algoritmo usado conta com um ajuste de tempo de resposta entre dois spikes, e assim um dos pico será descartado.	55
Figura 2.26 - A) Trechos mostrando os spikes detectados para as duas condições motoras em um mesmo experimento. Vemos que as linhas apresentam um padrão semelhante, ou seja, os disparos são semelhantes dado o mesmo estímulo (nulo e excitatório), um indício que estamos detectando os spikes do H1 corretamente nas duas condições. B) Ampliamos um trecho do sinal apresentado em "A" para mostrar que nesse experimento, em particular, houve uma queda brusca na amplitude do potencial de ação quando a mosca voou, caindo pela metade, mesmo assim o limite inferior e superior dinâmico que usamos conseguiu detectar o sinal de maneira esperada.	56
Figura 3.1 - Trecho mostrando o sinal acústico emitido pelo batimento da asa, as marcações com triângulos mostram cada pico que corresponde a um único batimento da asa	57
Figura 3.2 - A figura mostra trechos do sinal acústico para asa direita e esquerda. O estímulo visual é apresentado no topo do gráfico, as marcações em verde e vermelho indicam quando estímulo muda sua direção. A amplitude do sinal é encontrada achando o máximo e mínimo para cada batimento da asa e vê-se que essa amplitude diminui muitas vezes ao longo do experimento (a marcação com x indica um exemplo desse nó encontrado em cada asa).	58

Figura 3.3 - As amplitudes do sinal acústico foram salvas em um vetor a cada passo de 3,5s (160000 amostras) que corresponde a dois períodos do estímulo visual (a barra vertical varre duas vezes a tela alternando a direção esquerda-direita). A) Como exemplo, tem-se dois vetores sobrepostos, curvas verde e azul, obtidos a partir de um única asa (direita). Nessa figura é possível observar melhor os nós devido à diminuição da amplitude e que esses coincidem. B) O trecho do estímulo visual permite confirmar que a diminuição na amplitude no sinal acústico acontece quando o estímulo muda a direção. Verifica-se ainda que leva um tempo de milissegundos para que a mosca responda ao estímulo.	59
Figura 3.4 - Curvas médias das amplitudes (pico-a-pico) do sinal acústico normalizado para a asa direita (curva em vermelho) e esquerda(curva em azul) para todos os experimentos.	60
Figura 3.5 - O acelerômetro está acoplado à haste usada para prender a mosca dorsalmente. O sinal mostrado é a aceleração captada pelo dispositivo devido às vibrações causadas na haste em curtos intervalos que o inseto bate sua asa tentando um voo.	60
Figura 3.6 - Sinais do acelerômetro(vermelho),microfone (verde e azul). No topo temos o sinal do estímulo mostrando a direção em que está seguindo (E-esquerda,D-direita). As marcações em x mostram quando o estímulo mudou a direção para direita (vermelho) e esquerda (cinza), essas marcações ainda estão presentes no sinal acústico para mostrar a relação com uma diminuição na amplitude do sinal.	61
Figura 3.7 - Sinal de calibração do acelerômetro.	62
Figura 3.8 - A) Foto de um experimento feito em nosso laboratório com o acelerômetro. B) Ampliamos um pequeno trecho um pouco antes e um pouco depois do estímulo mudar a direção para mostrar que o sinal apresenta uma área mais positiva para o estímulo indo para direita e negativa na direção contrária. C) Média das curvas de velocidades obtidas em todos experimentos para os trechos correspondendo à uma única direção. Observa-se que a mosca apresentou uma velocidade de deslocamento mais positiva, mostrada pela curva vermelha, quando o estímulo foi para direita, e mais negativa, mostrada pela curva azul, para estímulo indo para a esquerda. Pela calibração do acelerômetro temos que a curva vermelha está indicando um deslocamento da mosca para esquerda e a curva azul para direita.	64
Figura 3.9 - Espectrograma do sinal acústico da asa direita utilizando transformada curta de Fourier, no topo vemos o estímulo visual mostrado para mosca, o mesmo das etapas anteriores. No espectrograma aparece periodicamente uma alteração na amplitude do sinal indicado por cores. O intervalo entre essas alterações é de aproximadamente um período do estímulo visual ocorrendo sempre que o estímulo muda para o sentido positivo.	65

Figura 3.10 - Sinal da acústica de uma asa variando a amplitude, cada pico corresponde a um batimento da asa. No primeiro trecho vemos que houve um aumento na amplitude do sinal, já no segundo houve uma diminuição. O traço preto indica os primeiros batimentos a apresentar essa variação, e vemos que essa variação persiste nos demais batimentos de maneira bem regular.	67
Figura 3.11 - Taxas de disparo para trechos do experimento sem estímulo com a mosca voando e sem voo.	68
Figura 3.12 - Raster para dois experimentos na condição de voo e não-voo.	69
Figura 3.13 - Dois raster para um mesmo experimento para condição de voo (direita) e não-voo (esquerda). Na parte inferior das figuras apresentamos as taxas de disparo. O quadrado na figura inferior da direita indica os picos na taxa devido ao aumento de disparos durante o voo nos instantes após o estímulo excitar o neurônio. Colocamos as setas vermelhas, nas duas taxas apresentadas, para comparar o aumento da taxa de disparo em todos os trechos curtos em que o estímulo foi excitatório.	70
Figura 3.14 - Curvas das taxas de disparo médias para todos experimentos, considerando apenas os trechos que o H1 foi estimulado por mais tempo.	71
Figura 3.15 - Curvas das taxas de disparo médias para todos experimentos. Na marcação (quadrado) indicamos um exemplo de como a curva sobe mais rapidamente para condição de voo.	72
Figura 3.16 - O deslocamento da distribuição da condição de voo para direita mostra que o tempo médio de ocorrência do primeiro spike é menor que na condição de voo e assim quando a mosca está voando sua resposta ao estímulo é mais rápida.	72

Sumário

1	Introdução	p. 23
2	Metodologia.....	p. 27
2.1	O sistema visual das moscas	p. 28
2.2	O neurônio H1	p. 29
2.3	O controle motor	p. 30
2.3.1	A musculatura do voo	p. 30
2.3.2	Os halteres	p. 32
2.4	Suportes, bancada do experimento e o posicionamento da mosca	p. 34
2.5	Desenvolvimento da eletrônica para capturar os sinais	p. 36
2.6	Criação das moscas e procedimento microcirúrgico	p. 39
2.7	Identificação e registro do H1	p. 42
2.8	Estímulo visual	p. 44
2.9	Registro motor	p. 45
2.9.1	Registro dos músculos de direção	p. 46
2.9.2	Acústica do batimento das asas	p. 49
2.9.3	Acelerômetro	p. 51
2.10	Deteção offline dos spikes	p. 53
3	Resultados e discussões	p. 57
3.1	Modulação visual na resposta motora	p. 57
3.2	Influência do voo na resposta do H1	p. 67
4	Conclusão.....	p. 75
	REFERÊNCIAS.....	p. 77

1 Introdução

Compreender o funcionamento do cérebro é um grande sonho para a ciência, decifrar a linguagem que os neurônios utilizam para “conversar” e assim elaborar pensamentos e comportamentos significa um avanço gigante com inúmeros impactos para humanidade. Porém, a tarefa de estudar um sistema tão complexo, como o cérebro humano, constitui um verdadeiro desafio e muitas vezes, faz-se necessário estudar sistemas nervosos mais simples e acessíveis, como o de insetos.

Moscas, por exemplo, são excelentes ferramentas para o estudo em diversas áreas da ciência, por exemplo o estudo do controle nervoso dos movimentos, apresentando vantagens como: rapidez, equilíbrio e extensa literatura a respeito de sua anatomia, sistema nervoso e gênico. Em particular, o sistema visual das moscas tem sido bastante utilizado como modelo para estudo do processamento de informação sensorial no sistema nervoso há décadas (1, 2). Não à toa, estes organismos possuem uma enorme quantidade de neurônios dedicados a captar e transmitir a informação visual, só os lóbulos ópticos representam cerca de um terço de todo o volume de cérebro (3).

Toda a informação visual é captada pela retina e transmitida através de neurônios de duas maneiras distintas: sinais elétricos e químicos. Os sinais elétricos correspondem a forma mais rápida de transmissão da informação e ocorrem devido a transferência de íons e pequenas moléculas entre as células, gerando pulsos elétricos também chamados de potenciais de ação. Já no outro caso, a comunicação entre os neurônios ocorre por meio da liberação de substâncias químicas, denominadas neurotransmissores ou mediadores químicos, e o processo acontece de forma mais lenta.

Nesse trabalho nós estamos interessados nos sinais elétricos de um neurônio presente no cérebro de moscas e que faz parte do seu sistema visual, o H1. Esse neurônio é sensível à

direção, respondendo com potenciais de ação a estímulos visuais que se movimentam horizontalmente. Vários trabalhos foram dedicados ao estudo desse mesmo neurônio (4, 5), a fim de desvendar como é que a informação visual dinâmica, é codificada em pulsos elétricos discretos (que nos referimos também como spikes), sendo posteriormente decodificada pelo Sistema Nervoso Central (SNS), que produz um comportamento motor adequado.

A maior parte dos trabalhos em eletrofisiologia *in vivo* são conduzidos, geralmente, assumindo que as propriedades das respostas dos neurônios sensoriais são as mesmas quando o animal está imobilizado, passivamente recebendo o estímulo ou quando pode se mover livremente. Considerando o quão diferente são as tarefas que um animal precisa resolver nessas duas condições e também os fatores como atenção, estabilidade, coordenação entre outros, não é surpreendente que o interesse em estudar a influência do comportamento do indivíduo na resposta sensorial tenha recebido cada vez mais atenção nos últimos anos (6–10). Motivados por diversos resultados de estudos recentes, nós decidimos desenvolver uma técnica que nos permitiu estudar a influência do comportamento motor na resposta do neurônio H1.

Em primata, por exemplo, o processamento do movimento visual é regulado pelo comportamento (11, 12). Estudos mostraram que a modulação da resposta “atencional” neuronal apareceu em um nível bem anterior ao esperado, a área temporal média visual (13). Nessa área o processamento era tido para ser puramente sensorial, possuindo neurônios sensíveis à direção que comunicam com regiões que controlam os movimentos dos olhos e os movimentos da mão. Porém, viu-se que as respostas desses neurônios são bastante influenciados pela atenção visual nesses indivíduos, e por sua vez essa atenção tem forte correlação com a tarefa que o indivíduo está realizando, ou seja, o comportamento que apresenta.

Outro exemplo da influência do comportamento no sistema sensorial é o córtex olfatório de ratos. Mostrou-se que respostas evocadas por odores mudam dependendo da atividade cerebral do neocortex, caracterizada por oscilações de ondas lentas (SWS) ou ondas rápidas (FWS) que indicam um estado de sono ou alerta, respectivamente (14). Muitas células nervosas do córtex olfatório mostraram uma resposta robusta por spikes para adequados odores durante FWS mas somente uma fraca resposta durante SWS.

Ainda em ratos, o processamento visual foi analisado enquanto eles eram colocados para correr em uma esteira (15). O resultado mostrou que no córtex visual primário (V1), vários neurônios aumentaram sua resposta quando a corrida foi executada. E a maioria desses neurônios responderam tanto ao movimento visual provocado pelo deslocamento do rato na esteira, quanto à estimulação visual, ou seja, quando o rato estava parado recebendo um estímulo que simulava uma corrida. Porém, em um subconjunto de neurônios, viu-se que a atividade neural presente durante a estimulação visual era suprimida durante a corrida na esteira. Assim o comportamento locomotor alterou a resposta de parte dos neurônios já no córtex visual primário.

Outro interessante exemplo vem do sistema eletro-sensorial dos peixes elétricos. Algumas espécies de peixes produzem, via órgãos sensoriais especializados, sinais elétricos periódicos que podem ser usados por exemplo para localizar uma presa (16, 17). A presença do sinal de outro peixe na vizinhança pode reduzir a habilidade de detectar objetos se estiverem disparando em uma frequência similar (18). Assim, um dos peixes geralmente muda a frequência do seu sinal (19–21). Apesar deste exemplo ilustrar um aspecto totalmente diferente do anterior, ele mostra que há influência do comportamento no processamento sensorial, mesmo que nesse caso a informação sensorial tenha sido ativamente alterada antes mesmo de chegar aos receptores.

Em insetos também há resultados que podem indicar uma influência do comportamento locomotor na resposta de neurônios sensoriais. Usando células tangenciais da placa lobular (LPTCs) de moscas-varejeiras, Rosner et al investigaram alterações no processamento de informação para dois estados diferentes de atividade dos halteres e também na ausência do movimento destes (10). O movimento dos halteres resultaram em um pequeno ganho na resposta do LPTCS quando houve uma estimulação visual. Recordando que a oscilação dos halteres possui a função de manter a estabilidade durante a ação de andar ou voar, e está, portanto, associada com a locomoção (22, 23).

Haag et al (24) chegaram a uma similar observação. O trabalho teve o foco nos neurônios motores do nervo cervical ventral (VCNM- ventral cervical nerve motoneuron) que controlam o movimento da cabeça em moscas, interagem com os LPTCs. Os movimentos dos halteres resultaram em uma modulação na atividade dos spikes desses neurônios motores.

Um recente estudo, também em moscas, utilizou imagem de cálcio para medir as respostas dos LPTCS quando os insetos eram colocados para caminhar em uma esteira (6). Houve um ganho na resposta dessas células que mostrou-se fortemente dependente da frequência temporal com que o padrão era apresentado. As respostas amplificadas foram ainda correlacionadas com a velocidade da caminhada. Em gafanhotos fez-se algo similar, e também observou-se que durante a caminhada ou mesmo durante o voo (8), ocorre um aumento na atividade dos LPTCs.

Dessa forma, motivados pelos resultados dos diversos estudos anteriores, nós decidimos desenvolver uma técnica que nos permita estudar a influência do comportamento motor, no caso o voo, diretamente no neurônio H1. Isso porque apesar de muitos avanços já terem sido obtidos, consideramos que o principal gargalo nas pesquisas feitas com o H1 é que, durante o procedimento experimental tradicional, o inseto permanece totalmente imobilizado e não tem qualquer poder de interferir na imagem que enxerga à sua frente, como ocorreria se ele decidisse, por exemplo, mudar a direção do voo. Estas condições estão muito longe de ser parecidas com as que o inseto enfrenta na realidade, nas quais ele usa uma quantidade grande de informação sensorial-motora em um curto intervalo de tempo para estimar o que está ocorrendo ao seu redor e assim controlar seus movimentos adequadamente (25, 26).

Assim, este projeto de mestrado pretendeu ser uma primeira fase em que aperfeiçoamos os experimentos com o H1. Desenvolvemos toda a instrumentação necessária para capturar o H1 com a mosca voando e obtivemos resultados preliminares que atestam a relevância da questão levantada por nós e mostram a importância de dar continuidade para esse trabalho.

2 Metodologia

Para investigar a influência do comportamento locomotor na resposta do H1, propomos uma metodologia diferente para medir a atividade do neurônio H1 enquanto a mosca, na qual, ao invés de estar totalmente presa (ver figura 2.1), irá apresentar atividade de voo, ainda que não tenha por enquanto qualquer controle sobre a imagem apresentada. Registramos também a atividade motora da mosca estudando a relação com o estímulo visual, a fim de investigar se há possibilidade de usar esse registro para movimentar a tela em experimentos futuros.

Desenvolvemos uma preparação na qual a mosca fica parcialmente livre; as patas e as asas livres para bater. Um sopro de ar foi usado para estimulá-las a exibir um comportamento de voo. Em um primeiro conjunto de experimentos, a atividade do neurônio H1 foi medida para um dado estímulo enquanto microfones registravam o comportamento das asas, indicando a atividade da asa e tornando possível separar, por exemplo, as condições voo e não-voo.

Em um outro conjunto de experimentos, não houve registro do H1. Esses experimentos foram feitos a fim de detectar apenas a tentativa da mosca de mudar a direção do voo. Em parte desses experimentos utilizamos um conjunto de eletrodos para registrar os potenciais de ação dos músculos de direção que controlam o voo. Em outra parte dos experimentos, menos invasiva e que se revelou uma estratégia melhor, utilizamos um microfone de cada lado da asa, posicionados à mesma distância e ângulos semelhantes. Por fim ainda utilizamos um acelerômetro acoplado à haste fixada na parte dorsal da mosca.

As informações sobre sistema visual e motor das moscas serão discutidos neste capítulo. Apresentamos também detalhes de todo o aparato desenvolvido para realizarmos os experimentos citados anteriormente, todo processo de criação e cirurgia das moscas e o protocolo experimental que criamos para capturar o sinal do H1 enquanto a mosca estava voando. Serão discutidas brevemente todas dificuldades e soluções para registrar o comportamento motor

Figura 2.1 – Fotos do aparato desenvolvido no IFSC pelo laboratório Dipteralab. a) Mosca está presa num tubo plástico colada com cera de dentista. O eletrodo de tungstênio e o fio de referência permitem capturar o sinal do H1. b) Mosca enxerga um estímulo visual constituído de barras verticais que se movem horizontalmente (27).

durante os experimentos. No ultimo tópico, apresentamos as ferramentas computacionais que utilizamos para extrair offline os tempos de ocorrência dos potenciais de ação no neurônio H1.

2.1 O sistema visual das moscas

Em moscas, como na maioria dos invertebrados, o olho constitui-se de uma estrutura construída a partir de muitos blocos elementares chamados omatídeos. Cada omatídeo possui sua própria lente e seu próprio conjunto de fotorreceptores. As imagens visuais percebidas pelo olho são retinotopicamente projetadas nas camadas do sistema visual, ou seja, relações de vizinhança entre os pontos de imagem conservam-se dentro do sistema nervoso. Como pode ser visto na figura 2.2, estas camadas são chamadas de lamina, medula e complexo lobular. Este último é dividido em lobula e placa lobular (28).

A placa lobular forma a parte posterior do complexo lobular. Essa área do cérebro contém neurônios envolvidos no controle do curso de voo das moscas (28, 29). Cada hemisfério da cabeça da mosca contém cerca de 60 diferentes neurônios denominados LPTCs (do inglês The

Figura 2.2 – A imagem percebida pela mosca é a combinação da informação recebida pelos vários omatídeos que compõem o olho composto do inseto. Cada omatídeo está orientado de tal maneira que recebe luz de um ponto diferente que o vizinho, toda a informação visual recebida pelos cerca de 10000 omatídeos vai passar pela lâmina, medula até chegar na placa lobular que contém várias dezenas de neurônios sensíveis a movimentos, o H1 é um deles.

Lobula Plate Tangential Cells) que são individualmente identificáveis baseando-se na anatomia e propriedades das respostas ao estímulo visual. As principais respostas ao estímulo ocorrem pelas células do sistema horizontal (HS) e do sistema vertical (VS). Como seus próprios nomes indicam esses neurônios recebem informação sobre o movimento no campo horizontal ou vertical, respectivamente. (30–34)

2.2 O neurônio H1

Anatomicamente o H1 é interessante pois suas arborizações se estendem sobre a placa lobular de ambos os hemisférios cerebrais. O axônio do H1 esquerdo atravessa até o lado contralateral e excita as células HS e CH da placa lobular direita (figura 2.3), que por sua vez inibe o H1 direito (35–37). Assim, as duas células H1 se inibem mutuamente.

O H1 é um neurônio que dispara em spikes, respondendo com um aumento na taxa de

Figura 2.3 – Conexões do H1 com seus vizinhos CH e HS. Devido à sinapse inibitória que ocorre entre o CH e o H1, pertencentes ao mesmo hemisfério, e a projeção do H1 no hemisfério contralateral excitando o HS e o CH, temos que a resposta do H1 é sempre inibida quando o outro H1 está ativo e vice versa.

disparo quando o padrão é movido horizontalmente de trás para frente da cabeça da mosca (chamamos de direção preferida), e com um decréscimo na taxa de disparo quando o padrão é movido na direção oposta, nessa situação dizemos que o neurônio está inibido (ver figura 2.4)(38). Assim como outros neurônios que respondem à direção, o H1 está entre os vários neurônios no sistema visual que mantem a mosca voando de forma estável. Os sinais provenientes do H1 enviam informação para os neurônios motores, que controlam os minúsculos músculos responsáveis por alterar a direção de voo.

2.3 O controle motor

2.3.1 A musculatura do voo

Para entender como o estímulo visual é convertido mecanicamente em um padrão motor que irá controlar os comportamentos de voo, diversos estudos têm voltado à atenção para a musculatura do voo das moscas. São dois grupos de músculos especializados que diferem tanto

Figura 2.4 – Neurônios presentes na placa lobular. Na foto a direita vemos o cérebro da mosca exposto, não é possível ver o neurônio H1 a olho nu mas tem-se uma ideia de sua arborização através da posição das traquéias encontradas no cérebro. Abaixo um sinal eletrofisiológico do H1, temos que um estímulo visual que excita e inibe o neurônio H1.

anatomicamente quanto no modo do controle neural. Tem-se os músculos de força IFMs (do inglês The Fibrillar Indirect Flight Muscles) - constituem a maior parte do volume da musculatura no tórax e a função é quase exclusivamente gerar força para o voo. Nesses músculos o tempo das contrações individuais é determinado pelas oscilações mecânicas do tórax e não pelos spikes no neurônio motor pré-sináptico. Os outros músculos são denominados músculos de direção (Steering Muscles) - nesse conjunto cada músculo possui um neurônio motor associado que controla sua ativação através de impulsos nervosos disparando uma única vez para cada batimento completo da asa. Embora representem uma pequena fração do volume total da musculatura, eles são cruciais no controle do voo e permitem as moscas executarem rápidas e complexas manobras (39). A figura 2.5 mostra um esquema de cada um desses dois grupos de músculos.

Ao contrário dos IFMs, os músculos de direção estão conectados aos elementos de esqueleto da asa e controlam diretamente os mecanismos de dobradiça, permitindo sutis mudanças

de um batimento para o outro. Essas mudanças permitem a mosca alterar a direção do seu voo, semelhante a um remador num rio cujos remos devem mudar um pouco a inclinação e amplitude para virar para a direita ou esquerda. São 17 músculos de direção para cada asa da mosca, sendo os mais estudados conhecidos por MB1 e MB2.

Como já dito, a maior parte dos músculos de direção são ativados uma vez a cada batimento da asa, mas a fase com que são ativados, ou seja, o momento durante o batimento, é cuidadosamente regulada pelo sistema nervoso. Um músculo de direção qualquer que não foi ativado pelo neurônio motor (i.e., não está contraindo) pode estar esticado ou mais encurtado devido a força que os demais músculos contraídos exercem sobre ele, assim como devido ao próprio movimento esquelético da dobradiça da asa.

Dessa forma, podemos pensar nos músculos de direção como um sistema de várias molas ligadas em uma haste móvel, dependendo do movimento da haste as molas estão mais esticadas ou mais comprimidas e isso as torna mais ou menos rígidas. Em um dado momento quando essa mola for ativada, essa rigidez irá determinar se sua amplitude de contração será maior ou menor. É através desse controle da fase de ativação dos músculos de direção que altera-se a mecânica da asa, regulando assim como a energia mecânica do IFMs é transformado em movimento das asas.

Mas já que todo o controle do incrível repertório de manobras das moscas dependem então desses minúsculos músculos que são controlados pelos neurônios motores, a questão é, como esses neurônios motores são regulados. Durante o voo, as células sensoriais das asas enviam sinais para o cérebro indicando “o estado do voo”, i.e., informações de sua própria condição (deflexão da asa devido à viscosidade do meio, por exemplo). Estes sinais serão usados no controle dos neurônios motores para decidir o tempo de ativação dos músculos.

2.3.2 Os halteres

Além das células das asas, outras células sensoriais também são importantes e enviam informações para o cérebro. Por exemplo, células presentes nas patas e nos halteres. Os halteres são asas traseiras evolutivamente modificadas e possuem a forma de um pêndulo presente em

Figura 2.5 – Adaptado de (40). Dois distintos grupos de músculos são responsáveis pelo voo. Os músculos de força e direção exercem diferentes funções gerando força e agilidade durante o voo, respectivamente.

cada lado da mosca.

A mosca possui apenas um par de asas, diferentemente de outros insetos como a libélula, por exemplo, que possui dois pares. O par modificado funciona como giroscópio durante o voo e sempre bate em anti-fase com as asas. Muitos estudos tem voltado a atenção para a influência que os halteres possuem no controle do voo. Sabe-se, por exemplo, que se uma mosca tem os dois halteres cortados ela não apresenta comportamento de voo.

Quando a mosca gira, cada haltere é defletido do seu plano de batida pela força de Coriolis. Sensores na base do haltere detectam essa deflexão e ativam reflexos compensatórios para manter o equilíbrio no voo (41, 42)(ver figura 2.6a).

Tanto o sistema visual como os halteres, portanto, detectam o movimento da mosca no espaço, mas fazem isso de maneiras distintas. As células VS e HS do sistema visual são mais sensíveis à rotações lentas da mosca, ao passo que estudos mostraram que os halteres detectam rotações mais rápidas (32). Outros estudos visam compreender como exatamente as diferentes entradas sensoriais; asa, haltere e sistema visual, são posteriormente integradas no sistema motor (44, 45). Para isso utilizaram um aparato que permite filmar as asas das moscas ao mesmo

Figura 2.6 – Figura adaptada de (43). A) Os halteres batem em antifase com as asas, na base desses halteres existe uma matriz de receptores sensoriais que respondem a uma pressão mecânica ou deformação resultando em mudanças na batida desses halteres. B) Haltere pintado com solvente e pó de ferro (tirada em nosso laboratório).

tempo que controlar o movimento dos halteres.

2.4 Suportes, bancada do experimento e o posicionamento da mosca

O aparato construído possui uma base quadrada (25x25cm) fixada na bancada experimental, podendo ser inclinada com relação à horizontal assim como girada no seu próprio eixo. Dessa forma damos condições ao experimentador para que mude a posição angular da mosca. Um monitor deve estar sempre posicionado em frente à mosca para mostrar um estímulo visual pré-definido.

A base fixa ainda possui um encaixe para uma base móvel de menor tamanho (figura 2.7). Esse pequeno suporte possui uma haste na qual posiciona-se um pino para insetos (insect pin 1), que possui a ponta acentuadamente curvada para permitir o encaixe de um pequeno pino de plástico colado na parte dorsal da mosca com cera de dentista e uma gota de cianoacrilato.

Acoplada a haste há uma placa de circuito impresso (3cmx3cm) com quatro fios de prata usados para aquisição dos músculos e um quinto fio que serve como aterramento. Na bancada experimental o suporte móvel é ligado à eletrônica necessária (amplificadores e filtros) para aquisição do sinal dos músculos.

Figura 2.7 – Fotos do aparato desenvolvido para medida do H1 e do comportamento locomotor.

A base móvel foi desenvolvida para que fosse possível usá-la ainda durante a cirurgia da mosca (realizada, em uma primeira etapa, em uma bancada diferente da bancada do experimento). A haste do suporte pode ainda ser inclinada com relação a horizontal permitindo maior mobilidade durante a cirurgia.

A base fixa em frente ao monitor possui quatro cavidades, duas frontais e duas traseiras. Encaixamos o suporte para os microfones no lado direito frontal e no lado esquerdo encaixamos um tubo de ar ligado a uma bomba regulável de ar de alta pressurização usado para estimular as moscas a voarem. Nas cavidades traseiras da base ficam os encaixes para um par de micromanipuladores com os eletrodos que capturam os sinais dos H1's do hemisfério direito e esquerdo. A mosca é posicionada no centro desse aparato, de frente para o monitor e com os microfones posicionados a uma distância igual de cada asa. A cabeça da mosca está inclinada e aberta

para permitir a medida do H1 (descrito em 2.6). Nos nossos experimentos capturamos o sinal apenas do H1 direito e por isso desenvolvemos apenas um micromanipulador para esse fim (ver figura 2.8).

Figura 2.8 – Micromanipuladores desenvolvido para captura do H1 do hemisfério direito com a mosca parcialmente solta.

2.5 Desenvolvimento da eletrônica para capturar os sinais

A aquisição dos tempos dos spikes do H1 foi feita extracelularmente através de um eletrodo de tungstênio com impedância entre 2 e 5 M Ω colocado na região de projeção do axônio do neurônio no hemisfério contralateral (hemisfério oposto ao que está recebendo o estímulo visual). Dessa forma o eletrodo direito pega o sinal do neurônio H1 esquerdo e vice versa. Como citado, vamos usar apenas o eletrodo direito.

O sinal do neurônio H1, da ordem de 100 μ V, é amplificado cerca de 10 mil vezes e em seguida filtrado (por um filtro ativo tipo Bessel de terceira ordem com frequência de corte de 300Hz e 5kHz, desenvolvido no laboratório), o sinal vai para uma placa de interface Análogo-

Digital (Digidata 1200), sendo digitalizado com uma taxa da ordem de 10kHz (ver foto do setup experimental na figura 2.9).

Devido à relação sinal ruído(SNR), que é a amplitude do sinal dividido pela amplitude do ruído, ter se apresentado muito baixa quando a mosca apresentou voo, ficou difícil usar um discriminador (geralmente usado nos experimentos tradicionais) que detectasse o spike quando este passasse um limiar de tensão. Esse limiar teria que ser ajustado manualmente durante o experimento toda vez que ela voasse ou mexesse as patas. Assim decidimos fazer a extração offline dos spikes utilizando o Matlab (7.11 (R2010b)).

Figura 2.9 – Foto do setup experimental. Pode-se ver a bancada do experimento com os monitores ligados e também o rack (a esquerda) com os equipamentos eletrônicos desenvolvidos para capturar o sinal.

O setup descrito é dividido em parte analógica (Analog Front End) e parte digital. O sinal captado requer um processamento analógico adequado por apresentar ruídos intrínsecos do sistema biológico assim como ruídos eletromagnéticos provenientes de sistemas eletrônicos e da rede elétrica. O Front End analógico, esquema apresentado na figura 2.10, é o responsável por realizar este processamento através dos filtros passa faixa e circuitos eletrônicos com estágios iniciais de alto ganho de tensão, baixo ruído, alta impedância de entrada e alta rejeição de ruído de modo comum. A instrumentação eletrônica detalhada do Front End analógico, inteiramente desenvolvida no laboratório de instrumentação eletrônica do grupo, é a seguinte:

- Micro eletrodo de tungstênio e a interface com o meio extracelular;

- Amplificador AC diferencial para micro-eletrodo (head stage) com um ganho de 100;
- Pré amplificador com um ganho de 100;
- Filtro Bessel passa-banda de terceira ordem;
- Monitor de áudio para monitorar o sinal captado pelo eletrodo.

Figura 2.10 – Diagrama em blocos do Front-End Analógico.

A placa digitada 1200 faz a ligação entre a parte analógica e a digital e permite olhar 16 canais simultaneamente. Usamos o software Axoscope (Axon Instruments) no computador para gravar o sinal do H1 e posteriormente tratá-lo a fim de obter os tempos de ocorrência de cada spike.

Faz parte ainda desse setup experimental um computador com saída analógica e resolução de 16bits que é utilizado para carregar o estímulo gerado e fazer a interface com o monitor (esse passo será discutido mais adiante).

2.6 Criação das moscas e procedimento microcirúrgico

As moscas são criadas no laboratório a partir de moscas fêmeas selvagens. Essas selvagens são atraídas com carne em decomposição, alimentadas e mantidas em cativeiro em temperatura (25°C) e umidade adequada para que coloquem ovos.

Figura 2.11 – Ciclo de vida da mosca-varejeira (nome científico *Chrysomia megacephala*)

As moscas depositam seus ovos sob carne crua e nós os retiramos cuidadosamente, transferindo-os para uma ração especial. A partir dos ovos eclodem as larvas que no ciclo seguinte se tornarão pupas. Essas são colocadas em baldes forrados com serragem e após cerca de 5 dias nascem as moscas (figura 2.11). Identificamos todos os baldes com a data do nascimento das moscas.

Para confrontarmos resultados obtidos em diferentes experimentos, temos que garantir que as repetidas realizações estejam sob mesmas condições de temperatura, umidade do ar e lumino-

cidade. Durante todo processo de criação das moscas o ambiente foi extremamente controlado.

Outro fator a ser levado em conta é a quantidade de moscas que ocupam um balde, quando muitas moscas nascem é necessário separá-las para evitar que quebrem as asas facilmente, uma vez que para o protocolo experimental estabelecido nesse projeto necessitamos das asas intactas. Por esses agravantes durante o projeto foi preciso desenvolver uma espécie de aquário que permitiu criar as moscas mais livres e em condições mais controladas de temperatura e umidade (figura 2.12).

Figura 2.12 – Aquário construído para armazenar as moscas com mais cuidado e permitindo um controle maior de temperatura e umidade.

Geralmente, para aquisição damos preferência para moscas da primeira geração com tempo de vida de 5 a 15 dias. A primeira parte da preparação é realizada pelo menos 12 horas antes do experimento:

- **um pequeno pedaço de plástico é colado perpendicularmente ao tórax dorsal da mosca, mantendo as asas livres. Para evitar qualquer tipo de interferência durante o experimento cobrimos com cera de dentista os olhos simples das moscas (também chamado ocellis), como mostrado na figura 2.13.** A necessidade de deixar a mosca com o plástico preso nas costas horas antes do experimento veio justamente por precisarmos de uma boa fixação da cola e da posterior observação de que a mosca de certa forma se

“acostuma” com esse plástico e pára de tentar tirá-lo com as patas, comportamento que pode dificultar a captura do sinal do H1 e músculos durante o experimento.

Figura 2.13 – Foto mosca presa dorsalmente. A mosca bate as asas e patas livremente.

Em uma etapa seguinte, feita no dia que será realizado o experimento, faz-se uma microcirurgia para expor a região do neurônio. Para isso primeiramente é necessário imobilizar a cabeça da mosca. A fixação da cabeça é um passo delicado e que precisou ser bem estudado.

- **a cabeça foi fixada ao tórax na parte dorsal ao invés da parte ventral como era feito nos experimentos em que a mosca ficava totalmente presa no tubo.** Uma grande dificuldade na realização do experimentos foi fazer com que a mosca apresentasse voo. Entre outros fatores, percebemos que o comportamento de voo era influenciado pelo ângulo com que a cabeça era fixada na parte dorsal. Depois de várias tentativas determinamos que ângulos rasos eram melhores, cerca de 20° ou 30°. A fixação do plástico, citada na etapa anterior, também mostrou-se ser uma boa solução para que ela voasse com mais frequência, além ainda da posição do estímulo de vento e os intervalos de alimentação (feitos entre os experimentos mas nunca durante).

- Durante a microcirurgia utilizamos um pequeno bisturi para realizar três incisões na parte posterior da cabeça da mosca, retirando quase totalmente a película de quitina que a envolve. Com uma pinça retiramos a fina camada de gordura presente na região do neurônio assim como o músculo próximo ao pescoço que contrai periodicamente e pode dar ruído nas medidas do H1. Finalmente, a mosca é levada à bancada de experimento, alimentada e posicionada em frente ao monitor de estímulos.

Figura 2.14 – Durante a cirurgia a quitina que reveste a parte traseira da cabeça da mosca é retirada para expor o cérebro. Um fio de prata agindo como terra é pendurado no canto direito da cabeça, parte inferior, em contato com a hemolinfa. Um eletrodo de tungstênio com impedância entre $3M\Omega$ a $5M\Omega$ é usado para achar o sinal do H1.

2.7 Identificação e registro do H1

Nessa altura, a cápsula da cabeça já está aberta e é necessário a adição de uma Solução de Ringer específica para moscas, evitando que a hemolinfa resseque rapidamente. O fio de prata de referência é colocado na hemolinfa e um eletrodo de tungstênio é usado para detectar o sinal extracelular do H1 (figura 2.14).

Figura 2.15 – Mosca posicionada entre dois microfones que registram o batimento acústico de cada asa. Um tubo de ar é colocado em frente a mosca para estimular o voo.

Com ajuda do monitor de áudio monitoramos se o sinal captado se trata com certeza do H1 ou não. E se for o H1 é necessário ainda verificar se não há outro neurônio interferindo no sinal. O melhor jeito de detectar possíveis ruídos é usar algum objeto colocado na frente da mosca movendo-se de forma a inibir e excitar o H1, não deve se ouvir nenhum disparo quando o neurônio está inibido. Uma vez o sinal encontrado, o estímulo é ligado e as respostas extracelulares do neurônio H1 são registradas por cerca de 40 minutos.

No protocolo que desenvolvemos para o H1, a ideia é sempre comparar a resposta da célula nas condições de voo e não-voo. Utilizamos o registro do microfone para separar as duas condições que queremos analisar (figura 2.15). Durante o experimento, com sorte, a mosca apresentou trechos longos de voo, mas quando os trechos foram muito curtos não os utilizamos na análise, muitas vezes sendo necessário descartar todo o experimento.

2.8 Estímulo visual

A imagem que a mosca observa são barras verticais que se movimentam na direção horizontal em um monitor de vídeo (modelo Tektronics 608). A posição da imagem é modificada a cada 2ms por um computador que controla o estímulo visual usando uma sequência de posições previamente definidas. O sistema de vídeo transforma cada posição, de 16 bits de resolução, em uma tensão correspondente entre 0 e 5 volts, que é aplicado ao controle da posição horizontal do monitor, alterando a posição da imagem. Não há movimento na vertical e a taxa de varredura do monitor é de cerca de 500 Hz (precisamos de uma alta taxa de varredura do contrário a mosca enxergaria como se fosse um sequência de slides à sua frente).

Figura 2.16 – A) Na figura inferior mostramos como varia a posição do estímulo visual no tempo para os experimentos do registro motor, o computador usará essas posições para controlar as barras verticais que se movimentam horizontalmente. Nesse caso vemos que o estímulo é simples e as barras vão varrer a tela indo para direita (reta crescente) e esquerda (decrecente). No topo apresentamos a velocidade desse estímulo, constante em módulo mas variando a direção a cada 0,8s. B) Posição do estímulo usado nos experimentos com o H1, o estímulo se repete a cada 2,5 com velocidade variando no tempo. No topo apresentamos um exemplo de como é a velocidade para uma única repetição do estímulo.

Utilizamos o software Matlab para gerar as posições dada ao computador com uma certa distribuição e correlação. Nos experimentos nos quais não houve registro do H1, apenas registro do comportamento motor, o estímulo usado foi bem simples (velocidade constante em módulo) e descorrelacionado, com período de 1,6s. Já nos experimentos com registro simultâneo do H1, o estímulo foi mais complexo, apresentando uma velocidade variando no tempo. Nesse último usamos um tempo de repetição de 2.5 segundos (ver figura 2.16).

2.9 Registro motor

Apesar de fugir do escopo desse projeto, a ideia é que os resultados obtidos através do registro motor permitam a realização de experimentos futuros nas quais a atividade de voo registrada, em tempo real, produzirá um deslocamento da imagem na direção em que a mosca teria seguido, produzindo assim um ambiente de voo virtual. A mosca estaria controlando totalmente a direção do seu voo de forma que o experimento se tornaria mais realístico e seria possível se aprofundar mais na investigação sobre a influência do comportamento motor do inseto na resposta do H1 (ver figura 2.17).

Figura 2.17 – Esse esquema mostra o aparato idealizado para medir a atividade do neurônio H1 enquanto a mosca apresenta atividade de voo registrada pelo microfone, acelerômetro e/ou registro dos potenciais de ação dos músculos de direção. O registro motor seria recebido pelo computador que através de um algoritmo em tempo real, controlaria o movimento da imagem apresentada. Dessa forma o H1 seria medido na condição em que inseto controlaria seu voo. Poderíamos investigar se a resposta do H1 nessas circunstâncias difere da resposta de quando o inseto não interfere no voo.

2.9.1 Registro dos músculos de direção

Inicialmente foi preciso conhecer a localização dos músculos de direção na *Chrysomia megacephala*. Para isso utilizamos moscas anestesiadas por frio e abrimos a quitina na altura do mesopraescutum, baseado no conhecimento anatômico em outras espécies. As moscas foram fixadas no fundo de uma placa de Petri. Os músculos de força foram cortados para expor somente os músculos de direção. Identificamos os Mb1 e Mb2 e com isso foi possível determinar um protocolo para realizar as medidas eletrofisiológicas.

Figura 2.18 – Localizamos os músculos de direção Mb1 e Mb2. Dessa forma determinamos o local onde os eletrodos deverão ser inseridos para medida eletrofisiológica.

Nós decidimos medir os músculos Mb1 e Mb2 pela facilidade de acesso e por serem os músculos mais estudados na literatura. Apesar desses dois músculos serem conhecidos por

produzirem semelhantes efeitos mecânicos sobre a asa, seus padrões de atividade durante o voo diferem consideravelmente. Alguns trabalhos mostram que o Mb2 é normalmente ativo apenas durante as curvas para o lado contralateral (46–50) enquanto o padrão de disparo do Mb1 é mais complexo e a sua função bem menos compreendida.

Em etapas anteriores à realização do experimento com o Mb1 e Mb2, as moscas foram anestesiadas por frio sendo colocadas em um freezer a -15°C por aproximadamente 3-4 min. Posteriormente, as moscas intactas foram penduradas dorsalmente no suporte móvel. Implantamos aos pares fios de prata com 0,025 milímetros de diâmetro no lado esquerdo e direito do animal. Esses fios foram colocados em cada um dos dois músculos de interesse através de pequenos furos feitos com bisturi na cutícula do inseto. Na figura 2.19 é possível ver os eletrodos implantados em uma lado da mosca. Esse procedimento sempre foi feito com 12 horas de antecedência, nesse intervalo as moscas tiveram tempo de voltar totalmente da anestesia.

Figura 2.19 – Fios de prata implantados na região dos músculos Mb1 e Mb2.

Até o momento do experimento as moscas são deixadas no suporte móvel com as patas apoiadas para evitar que batam as asas ou movam muito as patas tentando retirar o eletrodo. Esse procedimento ajudou na maior imobilização dos fios de prata, pois passado um certo tempo

a hemolinfa seca e é como se houvesse uma cicatrização do local no qual os fios estão inseridos.

Finalmente para a realização do experimento, a mosca foi levada para bancada experimental e estimulada a voar. Dois tipos de sinal foram gravados, os sinais eletromiográficos (EMG) e os sinais do batimento das asas discriminando a condição de voo e não-voo. Esses sinais foram exibidos ao longo de uma base de tempo comum para permitir a correlação temporal entre eles (veja exemplo na figura 2.20). Os potenciais extracelulares registrados foram amplificados utilizando um amplificador diferencial AC (AM System, modelo 1800) e digitalizados usando a Digidata 1200 e Axoscope software (Axon Instruments).

Figura 2.20 – A) Medida extracelular obtida do Mb2. B) Temos o sinal de Mb1 com alta amplitude e alguns spikes menores que provavelmente são disparos do Mb2 (setas) que acabam capturados pelos eletrodos que estão medindo o Mb1 (essa interferência de um sinal na medida do outro denominamos cross-talking).

Os dados dos experimentos feitos com os músculos foram coletados a partir de um total

de 12 moscas. Apesar disso em nenhum desses experimentos obtivemos o sinal extracelular durante tempo suficiente, isso porque apesar de todas precauções tomadas, a mosca apresentou trechos muito curtos de voo ou o eletrodo se movimentou e perdemos o sinal rapidamente. Depois de muitas tentativas decidimos que o experimento era inviável por ser extremamente invasivo e difícil, uma vez que ainda tínhamos que lidar com a cirurgia para expor o H1, que já se apresentava como um fator complicante na questão de inibir o voo. Decidimos então utilizar somente o registro das asas pelo microfone e o acelerômetro para nos fornecer registro da atividade motora e procurar nessas medidas o padrão que queríamos identificar nos músculos e que poderia nos fornecer informação de quando a mosca quer virar para esquerda ou para direita.

Assim apesar de ter desenvolvido toda instrumentação necessária e de ter conseguido algumas medidas eletrofisiológicas dos músculos, decidimos não utilizar mais os músculos de direção nesse projeto.

Para complementar o estudo dos músculos, vínhamos desenvolvendo um aparato baseado no estudo feito por (43). A ideia desse aparato foi desenvolver uma maneira simples para ter um parcial controle do haltere. Para isso, pintamos um haltere da mosca com uma tinta solvente com pó de ferro adicionado e, em seguida, controlamos o haltere magneticamente por meio de um ímã de neodímio (4 x 3mm) colocado a uma pequena distância do haltere. Já mostramos uma foto do experimento realizado por nós com haltere na figura 2.6b na seção 2.3.2. Posteriormente seria útil investigar se os halteres estariam influenciando no padrão de disparo dos músculos de direção captado por nós. Não foi necessário aplicar esse controle devido ao rumo do projeto com os músculos de direção, mas verificamos ser possível controlar os halteres de maneira razoavelmente fácil, pelo menos para uma abordagem inicial.

2.9.2 Acústica do batimento das asas

Os microfones usados para registrar a acústica do batimento da asa são pequenos, medindo não mais que 5mm de diâmetro e com uma resposta bastante direcional. Na figura 2.21 temos o circuito que desenvolvemos para os microfones. Muitos estudos têm sido dedicados a entender

Figura 2.21 – Circuito dos microfones.

a cinemática do batimento da asa dos insetos, para isso gravam o voo usando câmeras ultra-rápidas. O batimento da asa para cima e para baixo gera uma força de sustentação usada na propulsão do voo, assim como em uma ave, porém o inseto ainda bate suas asas para trás e para frente gerando uma força horizontal de arrasto devido à viscosidade do ar. Essa força é o que impulsiona seu voo, esse mecanismo assemelha-se aos animais aquáticos que usam a força de arrasto a partir da viscosidade da água, ou seja, pode-se dizer que as moscas voam como se estivessem nadando no ar.

Na figura 2.23a tem-se o inseto batendo suas asas para trás e para a frente horizontalmente. A segunda coluna (figura 2.23b) mostra a mosca voando para a esquerda, e vê-se claramente diferenças nas áreas das asas direita e esquerda. A área da asa nos diz sobre o ângulo de ataque da asa ou seja o ângulo que as asas encontram o ar. As diferenças no ângulo de ataque entre as asas geram forças de arrasto assimétricas e determinam a direção do voo.

Como nosso objetivo não é estudar toda a cinemática do voo, utilizamos um mecanismo mais simples e barato do que câmeras ultra-rápidas e conseguimos, através do par de microfones, captar quando há diferença de inclinação na asa devido ao som irregular que essas fornecem e assim temos pistas da direção do voo que a mosca queria seguir.

Figura 2.22 – Forças que atuam no voo da mosca.

Os microfones foram posicionados a mesma distância de cada asa, com mesmo ângulo e altura. Dessa forma quando as asas batem simetricamente as amplitudes mostradas são iguais, no caso de alguma asa se inclinar alguns graus de diferença percebemos que as amplitudes diferem.

2.9.3 Acelerômetro

As forças de sustentação e arrasto, citadas no capítulo anterior, provocam uma resultante na direção do voo. Quando a mosca está voando livremente, podemos decompor uma aceleração em cada um dos três eixos (X,Y e Z). No caso do protocolo experimental que usamos a mosca está livre para bater a asa mas não possui nenhum grau de liberdade para se mover. Porém a haste na qual a mosca está presa (o insect pin) possui uma certa flexibilidade que acaba por causar pequenas oscilações nos 3 eixos, que ocorrem devido ao batimento das asas.

Podemos medir a aceleração nesses eixos, utilizando um acelerômetro (chip MMA7361L Freescale) com saída analógica e sensor de aceleração operando em alta sensibilidade. A sensibilidade pode ser selecionada colocando o pino GS (G-SELECT) do acelerômetro em GND

Figura 2.23 – Foto extraída de (51). A mosca quando quer mudar sua direção de voo inclina mais uma asa do que a outra, essa diferença gera forças de arrasto assimétricas e produz uma aceleração para o lado que a mosca quer virar. Registramos essa aceleração utilizando a placa digidata.

(1.5g) ou em 3.3V (6g), ou seja, temos um bom intervalo de sensibilidade para operar e o mais importante uma alta sensibilidade, como mencionado. O acelerômetro possui dimensão 24mm x 18,0mm x 18,0mm e pesa aproximadamente 2 gramas, devido ao peso e tamanho do circuito inteiro não cogitamos colocar o circuito direto na mosca, o que poderia facilitar as medidas.

O acelerômetro foi então acoplado ao pino de metal em que a mosca está parcialmente colada (figura 2.24). O batimento das asas provocam pequenas vibrações do pino de metal devido as forças nele exercidas. Considerando o estímulo com movimento horizontal que estamos apresentando para mosca e o objetivo de obter um padrão que mostre a tentativa do inseto de mudar a direção da esquerda-direita ou vice-versa, ficamos interessados apenas na aceleração provocada no eixo x que corresponde ao deslocamento lateral.

Figura 2.24 – Diagrama com circuito eletrônico do acelerômetro e fotos do circuito acoplado à mosca.

2.10 Detecção offline dos spikes

Os spikes gerados pelo neurônio H1, captados por um eletrodo extracelular, possuem sempre o mesmo formato, variando de um experimento para outro apenas em amplitude. O intervalo entre as ocorrências dos spikes é o que está sempre mudando, mas nós sabemos qual o intervalo mínimo de tempo entre dois spikes subsequentes, ou seja, o tempo refratário do neurônio que vale 2ms. Todas essas informações facilitam a detecção dos spikes. Dessa forma, apesar de um sinal extracelular sempre estar propenso aos ruídos eletromagnéticos e/ou ruídos biológicos (como os potenciais de ação de neurônios vizinhos), temos como discriminar os potenciais de ação de interesse.

Usualmente, nos experimentos com a mosca presa, a ocorrência dos spikes é detectada através da discriminação em tempo real efetuada por hardware dedicado, construído com circuitos analógicos e digitais desenvolvidos para eliminar esses ruídos mencionados e registrar apenas os instantes de ocorrência destes pulsos, armazenando-os no computador (52, 53). Neste trabalho, no entanto, optou-se pela detecção offline dos spikes, ou seja, gravamos todos os sinais do

experimento e só depois usamos um algoritmo para reconhecer os potenciais do H1 e extrair os tempos de disparo.

Escolhemos a detecção offline, pois no caso de nosso experimento aparecem agravantes como os ruídos de alta frequência devido ao movimento das asas e patas. E ainda, como a mosca pode voar e ficar parada num mesmo experimento, vimos que teríamos que ajustar os parâmetros do discriminador o tempo todo pois a amplitude do sinal fica mais instável. Mesmo com todas precauções tomadas, pode ocorrer um mínimo deslocamento da ponta do eletrodo, causado até por uma maior agitação da hemolinfa. Em algumas medidas observamos uma queda brusca da amplitude do sinal que caiu até pela metade na transição de não-voo para voo.

Assim, desenvolvemos um algoritmo que primeiramente separa o sinal de voo e não-voo. Após isso, tratamos cada condição separadamente.

- Um filtro passa-banda é usado para remover qualquer artefato de baixa frequência que possa estar na medida.
- O passo seguinte é detectar vários máximos locais dentro do sinal, ou seja os picos presentes no sinal.
- Calculamos a derivada do sinal e com isso fazemos uma pré-seleção de possíveis spikes. Para um pico ser considerado um “possível spike” ele deve ser um ponto de máximo assim como sua derivada deve ser um pico máximo também.

Na figura 2.25 mostramos um trecho do sinal filtrado do H1 para um experimento na condição de voo e não-voo, obtido pela medida extracelular do neurônio H1. As marcações na figura 2.25 indicam possíveis spikes, vemos que quando a mosca apresenta voo temos mais picos máximos detectados e com uma amplitude mais variável.

- A partir dos picos encontrados definiremos um limite superior e inferior de amplitude, ou seja, os limiares que se alcançados definem que o pico encontrado é mesmo um spike.

Os limites inferior e superior foram estimados a partir do cálculo da variância do sinal dentro de uma janela de tempo que se desloca entre os picos encontrados (ver janela em 2.25).

Figura 2.25 – Picos encontrados num trecho filtrado do sinal extracelular do H1 na condição de voo e não-voo. As janelas coloridas representam as janelas que usamos para deslizar entre os picos detectados e calcular um limiar simples superior e inferior que vão definir se o pico é ou não um spike. Na figura inferior, vemos um caso em que foram detectados dois picos com características de spikes, porém temos um intervalo menor que o tempo refratário do neurônio de 2ms entre os dois. O algoritmo usado conta com um ajuste de tempo de resposta entre dois spikes, e assim um dos pico será descartado.

Para achar o limite inferior multiplicamos o valor obtido em cada janela por três, esse valor calibra o limiar para uma proporção que vimos estar satisfatória. Dessa forma em cada janela os limiares podem mudar um pouco devido a ocorrência de alguma mudança na amplitude do sinal.

Dependendo do local onde posicionamos o eletrodo, vemos que os potenciais de ação do H1 captados no meio extracelular apresentam uma amplitude variável entre $2\mu\text{V}$. O limiar superior, é calculado para evitar que detectamos um sinal com valor muito maior que isso. Levamos em conta que qualquer alteração na amplitude do sinal, já está afetando a escolha do limiar inferior e assim os picos que são spikes podem variar um tanto mas não chegarão a atingir um valor tão maior que o limiar inferior. Caso um pico ultrapasse o limiar superior é considerado um ruído e assim será descartado na medida. Um exemplo de interferência no sinal, cuja derivada dá um pico muito alto, pode ocorrer quando mosca bate a pata no eletrodo rapidamente.

O algoritmo conta também com um ajuste de tempo de resposta, uma vez e que o período refratário do neurônio é conhecido, sabemos que o tempo entre um disparo e o próximo não

pode ser menor que este intervalo, qualquer sinal que seja detectado dentro deste tempo após um spike ser encontrado será descartado.

Na figura 2.26 apresentamos graficamente o resultado obtido no final da detecção dos spikes para condição de voo e não-voo. As linhas verdes no gráfico indicam os spikes detectados.

Figura 2.26 – A) Trechos mostrando os spikes detectados para as duas condições motoras em um mesmo experimento. Vemos que as linhas apresentam um padrão semelhante, ou seja, os disparos são semelhantes dado o mesmo estímulo (nulo e excitatório), um indício que estamos detectando os spikes do H1 corretamente nas duas condições. B) Ampliamos um trecho do sinal apresentado em "A" para mostrar que nesse experimento, em particular, houve uma queda brusca na amplitude do potencial de ação quando a mosca voou, caindo pela metade, mesmo assim o limite inferior e superior dinâmico que usamos conseguiu detectar o sinal de maneira esperada.

Como estamos interessados apenas nos tempos de ocorrência dos spikes, o último passo que o algoritmo realiza é discretizar os spikes detectados em bins. O tamanho da janela que escolhemos para um bin é de 2ms, se o spike ocorre dentro de um intervalo o bit 1 é atribuído ao bin, caso contrário é atribuído bit 0.

3 Resultados e discussões

3.1 Modulação visual na resposta motora

Para confirmar se as moscas mostram comportamento de voo normal nas condições de nossos experimentos, a resposta motora foi medida em preparações nas quais prendemos o inseto dorsalmente e imobilizamos a cabeça mas não houve registro do H1. Os experimentos tiveram duração de 40 minutos e a mosca voou quase em tempo integral. A frequência do batimento da asa foi calculada identificando os picos correspondentes a uma batida completa de cada asa (ver figura 3.1). A frequência em média do batimento foi de 168 ± 5 Hz ($n = 6$) Este resultado está de acordo com o que sabemos da literatura do voo da mosca(para comparação(54)) e demonstra, em partes, que moscas que voam parcialmente presas apresentam uma resposta motora normal.

Figura 3.1 – Trecho mostrando o sinal acústico emitido pelo batimento da asa, as marcações com triângulos mostram cada pico que corresponde a um único batimento da asa

Quando ligamos um estímulo visual, constituído de barras verticais que se movem para direita e esquerda, os microfones posicionados próximo a cada asa registraram algumas mudanças

no sinal acústico. Alterações na amplitude (pico-a-pico) da asa ocorreram durante ou logo após uma mudança na direção do estímulo. A figura 3.2 apresenta alguns trechos do sinal gravado da asa direita e esquerda durante um experimento.

Figura 3.2 – A figura mostra trechos do sinal acústico para asa direita e esquerda. O estímulo visual é apresentado no topo do gráfico, as marcações em verde e vermelho indicam quando estímulo muda sua direção. A amplitude do sinal é encontrada achando o máximo e mínimo para cada batimento da asa e vê-se que essa amplitude diminui muitas vezes ao longo do experimento (a marcação com x indica um exemplo desse nó encontrado em cada asa).

Em uma análise qualitativa desses trechos, observamos que na maior parte do tempo a mosca aparenta responder ao estímulo visual através da alteração do movimento de uma asa em relação à outra, como faz quando quer alterar a direção de seu voo. O sinal apresentou alguns “nós”, relacionados a uma diminuição da amplitude do sinal, quando o estímulo mudou a direção (ver figura 3.2). Quando comparamos os nós na asa direita e esquerda verificamos que eles aparecem de maneira “antifásica” dependendo do lado para qual o estímulo mudou. A asa direita apresentou uma diminuição da amplitude um pouco depois do estímulo mudar sua direção para direita (ver figura 3.3a), já a asa esquerda teve um comportamento similar mas oposto, apresentando essa diminuição quando o estímulo foi para esquerda. O intervalo de tempo observado entre a mudança na direção do estímulo e a resposta motora, em média um valor de 25ms, provavelmente aparece devido ao tempo de alguns milissegundos que a mosca

leva para processar e reagir ao estímulo visual.

Figura 3.3 – As amplitudes do sinal acústico foram salvas em um vetor a cada passo de 3,5s (160000 amostras) que corresponde a dois períodos do estímulo visual (a barra vertical varre duas vezes a tela alternando a direção esquerda-direita). A) Como exemplo, tem-se dois vetores sobrepostos, curvas verde e azul, obtidos a partir de um única asa (direita). Nessa figura é possível observar melhor os nós devido à diminuição da amplitude e que esses coincidem. B) O trecho do estímulo visual permite confirmar que a diminuição na amplitude no sinal acústico acontece quando o estímulo muda a direção. Verifica-se ainda que leva um tempo de milissegundos para que a mosca responda ao estímulo.

Para quantificar esse resultado, consideramos todos os experimentos realizados, normalizamos o sinal da amplitude e fizemos uma média das amplitudes ao longo dos trechos de 3,5s do sinal acústico, separadamente para cada asa. Para isso utilizamos uma janela de tamanho L (0,1s), que achamos ser adequada para preservar quando houvesse os “nós” observados. Assim, em todos os experimentos obtivemos várias curvas para cada asa e na figura 3.4 mostramos as curvas médias desses resultados.

Figura 3.4 – Curvas médias das amplitudes (pico-a-pico) do sinal acústico normalizado para a asa direita (curva em vermelho) e esquerda (curva em azul) para todos os experimentos.

Confirmamos que as amplitudes da esquerda e da direita foram moduladas em fase contrária dependendo da direção do movimento padrão visual, refletindo uma tendência da mosca em querer mudar a direção do voo quando o estímulo muda a direção (figura 3.4). Mas será que temos como afirmar que a mosca tentou fazer um movimento contrário à direção do estímulo visual?

Quando viramos a cabeça, por exemplo, a imagem do nosso campo visual se desloca em sentido contrário ao movimento realizado pela cabeça. Nos insetos também é assim, surge um fluxo ótico contrário à direção de voo. Portanto, nós esperaríamos que se um estímulo move-se para a direita, a mosca mudaria a batida das asas de modo a ter uma força resultante para a esquerda, obviamente o oposto aconteceria para o estímulo indo para esquerda.

Figura 3.5 – O acelerômetro está acoplado à haste usada para prender a mosca dorsalmente. O sinal mostrado é a aceleração captada pelo dispositivo devido às vibrações causadas na haste em curtos intervalos que o inseto bate sua asa tentando um voo.

O resultados obtidos até agora mostram uma mudança exatamente na asa contrária à direção de voo esperada. Se voltarmos ao exemplo do remador, o qual citamos na introdução, cujos remos de modo semelhante às asas, necessitariam exercer uma força no lado contralateral ao

deslocamento desejado, teríamos um resultado coerente e que fornece um bom indício de que a mosca se comportou como esperado. Apesar disso, a falta de informação mais detalhada sobre o movimento de cada asa durante o experimento, torna qualquer conclusão um pouco especulativa.

Figura 3.6 – Sinais do acelerômetro(vermelho),microfone (verde e azul). No topo temos o sinal do estímulo mostrando a direção em que está seguindo (E-esquerda,D-direita). As marcações em x mostram quando o estímulo mudou a direção para direita (vermelho) e esquerda (cinza), essas marcações ainda estão presentes no sinal acústico para mostrar a relação com uma diminuição na amplitude do sinal.

Uma maneira que encontramos para confirmar nossa análise foi medir mais diretamente a direção que a mosca tentou voar utilizando um acelerômetro acoplado à haste usada para prender a mosca dorsalmente. A figura 3.5 mostra um trecho do sinal de saída desse dispositivo durante um experimento feito com a mosca. Cada trecho de sinal corresponde a um trecho de voo. Observa-se que o inseto passou a apresentar trechos bem mais curtos de voo. Talvez isso se deva ao peso que o dispositivo exerceu na haste, de qualquer forma o acelerômetro se mostrou

bastante sensível e conseguiu capturar bem as vibrações provocadas na haste quando o inseto bate as asas.

Gravamos com a placa digidata os sinais dos microfones, do estímulo e do acelerômetro ($n = 5$), mostrados na figura 3.6. O sinal do acelerômetro (em vermelho) indica o começo e a interrupção de um trecho de voo, como já explicado. As medidas com os microfones (verde e azul) mostram claramente que a fase contrária nas amplitudes do sinal das asas continuam aparecendo nesses experimentos. As marcações indicam trechos no gráfico em que o estímulo mudou a direção e que percebemos uma mudança na resposta acústica. A diminuição da amplitude que ocorre em diferentes momentos no sinal das asas dependendo do estímulo visual, está de acordo com o que vimos na figura 3.2.

Figura 3.7 – Sinal de calibração do acelerômetro.

A figura 3.7 mostra um trecho de um sinal obtido para calibrar a resposta do acelerômetro

à direção/sentido. O dispositivo foi posicionado em frente ao monitor, exatamente da maneira como fica durante o experimento com a mosca. Através de uma pinça causamos vibrações no eixo x na haste presa ao dispositivo. Ora as vibrações foram feitas para uma lado, ora para outro.

O sentido foi obtido através da integral do sinal, dada pela área sob a curva. Para o acelerômetro deslocado para a esquerda vemos que há um deslocamento de todo o sinal mais para o eixo positivo e o oposto ocorre para um deslocamento para direita.

O registro do sinal do acelerômetro obtido durante o experimento com a mosca foi analisado na condição do estímulo indo para direita e esquerda separadamente. Assim dividimos o sinal em trechos de meio período do estímulo (0,8s), ou seja, correspondendo a uma única direção, e calculamos a integral do sinal, posteriormente fizemos uma média de todas as curvas de velocidade obtidas nesses trechos. O mesmo foi repetido para outra direção. Esse resultado está mostrado na figura 3.8, no qual temos um exemplo do experimento com um trecho de saída do acelerômetro um pouco antes e um pouco depois do estímulo mudar a direção, assim é possível verificar o deslocamento da curva, mais positiva para uma direção e negativa para outra.

Na figura 3.8c temos as duas curvas médias de velocidades para cada direção do estímulo. Para o estímulo indo para direita temos um deslocamento da curva mais positivo (curva vermelha), indicando que na média a mosca apresentou uma velocidade de deslocamento para esquerda. O oposto se observa quando o estímulo muda a direção (curva azul). Assim, as curvas confirmaram que na média a mosca respondeu ao estímulo visual realizando movimentos na direção contrária ao fluxo ótico.

Figura 3.8 – A) Foto de um experimento feito em nosso laboratório com o acelerômetro. B) Ampliamos um pequeno trecho um pouco antes e um pouco depois do estímulo mudar a direção para mostrar que o sinal apresenta uma área mais positiva para o estímulo indo para direita e negativa na direção contrária. C) Média das curvas de velocidades obtidas em todos experimentos para os trechos correspondendo à uma única direção. Observa-se que a mosca apresentou uma velocidade de deslocamento mais positiva, mostrada pela curva vermelha, quando o estímulo foi para direita, e mais negativa, mostrada pela curva azul, para estímulo indo para a esquerda. Pela calibração do acelerômetro temos que a curva vermelha está indicando um deslocamento da mosca para esquerda e a curva azul para direita.

Em uma próxima etapa, nos experimentos no qual registramos H1, utilizaremos apenas as medidas do microfone. O acelerômetro não foi usado pois atrapalharia a inserção e as medidas feitas pelo eletrodo no cérebro, além de ser mais um empecilho para a mosca apresentar voo constante ou com trechos de longa duração. Porém, o acelerômetro foi um instrumento essencial para que finalmente obtivéssemos a informação necessária para indicar a direção que a mosca tentou voar e assim validar as medidas capturadas pelo microfone. Podemos concluir que a modulação na acústica da asa indicou uma tentativa de mudar o voo para direção contralateral.

Para prosseguir com os experimentos fez-se necessário analisar se o comportamento de voo continuava normal também na condição em que cabeça da mosca estava aberta e o neurônio H1 sendo medido. Apesar da inserção do eletrodo aumentar drasticamente a dificuldade de estimular a mosca a permanecer voando, o registro da acústica da asa direita mostrou que a frequência de batida teve um resultado normal (em média de 172 ± 7 Hz ($n = 3$)).

Essa frequência foi obtida através de um espectrograma utilizando transformada curta de Fourier. O espectrograma é ideal para analisar a evolução espectral de um sinal como o da asa, que é um sinal complexo e variável no tempo. Representamos o espectrograma através do gráfico no qual a abscissa corresponde ao tempo e a ordenada a frequência. Uma terceira dimensão contém a amplitude de cada frequência e é representada por uma cor (ver figura 3.9).

Figura 3.9 – Espectrograma do sinal acústico da asa direita utilizando transformada curta de Fourier, no topo vemos o estímulo visual mostrado para mosca, o mesmo das etapas anteriores. No espectrograma aparece periodicamente uma alteração na amplitude do sinal indicado por cores. O intervalo entre essas alterações é de aproximadamente um período do estímulo visual ocorrendo sempre que o estímulo muda para o sentido positivo.

As cores vermelha e amarela correspondem a picos (indicando alta densidade da frequência), enquanto os tons azuis correspondem a valores baixos. Podemos verificar pelo traço na cor vermelho, uma alta frequência que se deve ao batimento da asa com valor de 172Hz (frequência

principal). As demais frequências que enxergamos no espectro nada mais são que harmônicos da frequência principal, não sendo importante nessa análise.

O espectrograma foi feito a partir da média das amplitudes do sinal acústico da asa direita para vários trechos de 12s do estímulo simples usado nos experimentos anteriores (essa janela de tempo foi escolhida levando em conta o tempo médio de duração de um voo contínuo da mosca durante os experimentos, com essa janela de tempo quase todos trechos de voo foram analisados, poucos trechos menores que 12s foram descartados na análise). Vemos no espectrograma que aparece periodicamente uma alteração na terceira dimensão representada por cores, indicando uma alteração na amplitude do sinal. O intervalo entre essas alterações é de aproximadamente um período do estímulo visual ocorrendo sempre que o estímulo muda para o sentido positivo. Esse resultado está de acordo com o que obtivemos anteriormente, mostrando que a asa direita da mosca respondeu com uma diminuição na amplitude com estímulo indo para esquerda. Assim no experimento com H1, a resposta motora da mosca é normal.

Como já mencionado, a relação obtida entre a resposta motora e o estímulo visual poderá ser usada para controlar o estímulo visual. Na figura 3.10 temos um trecho do sinal acústico ampliado para mostrar cada batimento da asa e o instante que ocorre as primeiras variações na amplitude desse sinal (ver traço preto na figura 3.10b indicando os primeiros sinais que apresentam mudanças na amplitude). Quando há um aumento ou diminuição na amplitude do sinal acústico em um batimento isso parece se manter ocorrendo de maneira regular nos subsequentes.

Assim, não parece muito absurdo calcular que precisaríamos só de cerca de 4-5 batimentos, talvez menos, para certificar que realmente a mosca está apresentando uma alteração na batida de uma asa a fim de virar para um lado específico. Com a frequência de batimento próxima a 170Hz, calculamos aproximadamente 23ms para que o computador desse um comando, por meio de um algoritmo específico, para tela se mover na direção oposta ao movimento que a mosca quer fazer. Essa é apenas uma estimativa mas muito boa considerando que o tempo de reação da mosca é maior que isso, em média 30ms. Ou seja, forneceríamos um estímulo novo, cujo deslocamento foi “decidido” e controlado pela própria mosca, antes que essa realizasse

outra manobra.

Figura 3.10 – Sinal da acústica de uma asa variando a amplitude, cada pico corresponde a um batimento da asa. No primeiro trecho vemos que houve um aumento na amplitude do sinal, já no segundo houve uma diminuição. O traço preto indica os primeiros batimentos a apresentar essa variação, e vemos que essa variação persiste nos demais batimentos de maneira bem regular.

3.2 Influência do voo na resposta do H1

Obtivemos sucesso em registrar os potenciais de ação do H1 na condição da mosca parcialmente solta, apesar que vale ressaltar, que a taxa de sucesso é baixa, foram várias tentativas de registro e poucos acertos (cerca de 100 moscas para somente 3 experimentos que tivemos sucesso, nos demais a mosca não apresentou comportamento de voo ou perdíamos o sinal rapidamente).

O primeiro passo para caracterizar se há ou não influência de voo na resposta do H1, primeiramente medimos a atividade espontânea do neurônio, ou seja o disparo do neurônio sem estímulo visual nenhum. A figura 3.11 traz a taxa de disparo média de todos os experimentos ($n = 3$). Essas taxas foram medidas em janelas de 3 segundos nos quais calculamos o número de spikes em um intervalo de tempo de 10 milissegundos. Esse tamanho da janela foi escolhido com base no trecho de menor tempo de voo que foi considerado nas análises.

Ao longo da gravação, a taxa de disparo durante o voo manteve-se bem mais elevada do que durante a fase não-voo. Em geral, o desvio padrão da taxa de disparo entre as condições de voo e não-voo foi parecida (não-voo: 10,7 Hz; voo: 9,2 Hz). Em nenhuma das duas condições percebemos variações muito altas na taxa de disparo, o que seria esperado caso houvesse muitas interferências na detecção dos spikes devido aos movimentos das antenas, halteres ou pernas.

Figura 3.11 – Taxas de disparo para trechos do experimento sem estímulo com a mosca voando e sem voo.

Um estímulo visual que se repete a cada 2,5s foi dado para mosca (ver 2.8). Para analisar visualmente os dados obtidos nos experimentos achamos eficiente utilizar um gráfico tipo raster. Nesse gráfico, o eixo x representa o tempo dos disparos dentro de um período do estímulo, e o eixo y representa o número de repetições desse período. Cada linha indica os spikes disparados em uma única repetição, se olharmos para as colunas dado um certo Δt temos várias respostas para o mesmo comportamento do estímulo.

Na figura 3.12 apresentamos o raster para condição voo e não-voo para dois diferentes experimentos mostrando a repetibilidade do resultado em diferentes moscas. No segundo raster mostramos ainda velocidade do estímulo (curva azul). Velocidades positivas movimentam a imagem na direção preferencial do H1, gerando alta taxa de disparo, enquanto que velocidades negativas inibem o H1. Vemos que o padrão que os rasters apresentam está de acordo com a resposta do neurônio H1 para estímulos excitatórios e inibitórios. Os rasters mostraram uma correlação alta entre resposta e estímulo nas duas condições motoras, caso isso não fosse verdade e o neurônio não respondesse ao estímulo ou se estivéssemos captando muito ruídos o gráfico apresentaria vários pontos dispersos e não enxergaríamos nenhum padrão na resposta.

Figura 3.12 – Raster para dois experimentos na condição de voo e não-voo.

Na figura 3.13 temos os rasters na condição voo e não-voo para outro experimento . Nessa figura apresentamos também as taxas de disparo dos spikes, calculadas a partir da soma dos pontos das colunas para um certo Δt . Observando as taxas nota-se que houve um aumento na taxa de disparo para condição de voo, nos primeiros instantes que procedem o cruzamento de zero do estímulo na direção positiva, ou seja, quando o estímulo muda a direção excitando o H1. Após alguns instantes desse aumento é possível perceber que as taxas se igualam, apesar da condição de não-voo indicar um disparo bem mais regular quando o neurônio é excitado.

Ainda na figura 3.13, quando comparamos os trechos de menor duração em que o neurônio estava excitado (as setas vermelhas indicam esses trechos), é possível verificar um aumento significativo no disparo para condição de voo. Pensamos que provavelmente isso acontece porque não houve tempo suficiente para que os disparos voltassem ao normal e se igualassem,

Figura 3.13 – Dois raster para um mesmo experimento para condição de voo (direita) e não-voo (esquerda). Na parte inferior das figuras apresentamos as taxas de disparo. O quadrado na figura inferior da direita indica os picos na taxa devido ao aumento de disparos durante o voo nos instantes após o estímulo excitar o neurônio. Colocamos as setas vermelhas, nas duas taxas apresentadas, para comparar o aumento da taxa de disparo em todos os trechos curtos em que o estímulo foi excitatório.

então o que vemos é um aumento semelhante ao que ocorre nos trechos de maior duração, um aumento que dura um intervalo de tempo após o estímulo começar a excitar o neurônio. Além desses picos na taxa de disparo de disparo, nota-se ainda um aumento considerável na taxa de disparo nos tempos que o neurônio está recebendo um estímulo inibitório. E ainda, nos últimos 0,5s, nos quais o estímulo não se movimenta, vemos que a taxa de disparo apresentou um aumento semelhante ao visto na figura 3.11, na qual realizamos experimentos inteiros sem nenhum estímulo.

Para ficar mais evidente o aumento nos primeiros instantes da taxa de disparo, apresentamos na figura 3.14 a taxa média de disparo calculada somente nos maiores trechos em que o neurônio foi estimulado. Confirmamos o comportamento anteriormente observado, no início a taxa para condição de voo apresenta uma aumento considerável e após alguns milissegundos a taxa se iguala à condição de não-voo.

Esse resultado serve ainda para mostrar que o aumento anterior verificado na taxa espontânea não pode ser devido à ruído, já que nesse caso também observaríamos um aumento de quase

o dobro em todos os trechos dos experimentos com estímulo. Um ruído causado pelo batimento das asas, por exemplo, estaria presente em todo o experimento. No caso de haver algum problema na detecção dos spikes e algumas vezes um ruído fosse erroneamente identificado como spike, esse ruído seria aleatório, e assim não veríamos um aumento na taxa de disparo apenas no início do estímulo excitatório ou durante um estímulo estacionário.

Figura 3.14 – Curvas das taxas de disparo médias para todos experimentos, considerando apenas os trechos que o H1 foi estimulado por mais tempo.

Na figura 3.15 mostramos as curvas das taxas de disparo médias de todos experimentos realizados com estímulo para as duas diferentes condições motora.

A análise dessas curvas indicam que há ainda um atraso no tempo de resposta do H1 ao estímulo, na condição de não-voo quando comparamos com voo, na figura há um quadrado indicando um exemplo desse atraso. Observa-se que a curva azul (mosca voando) sobe antes que a curva vermelha (voo) quando o estímulo excita o neurônio, já durante a inibição as curvas caem aproximadamente juntas.

Para visualizar e quantificar esse resultado fizemos um histograma dos intervalos de ocorrência do primeiro spike disparado logo após um estímulo excitatório. O histograma apresentado na figura 3.16 mostra a distribuição desses intervalos para os experimentos realizados.

O resultado confirma que durante o voo a resposta ao estímulo acontece mais rapidamente,

Figura 3.15 – Curvas das taxas de disparo médias para todos experimentos. Na marcação (quadrado) indicamos um exemplo de como a curva sobe mais rapidamente para condição de voo.

Figura 3.16 – O deslocamento da distribuição da condição de voo para direita mostra que o tempo médio de ocorrência do primeiro spike é menor que na condição de voo e assim quando a mosca está voando sua resposta ao estímulo é mais rápida. .

verificado pelo deslocamento para direita da curva verde representando a condição de voo, ou seja, o intervalo de tempo médio de ocorrência do primeiro spike é menor. No histograma pode-se observar ainda que a resposta do neurônio ao estímulo não é instantânea. O sistema leva um tempo finito para transmitir a informação dos fotoreceptores ao neurônio. Portanto, vemos que

durante o voo esse tempo foi menor.

Durante o desenvolvimento desse trabalho encontramos alguns estudos que se propuseram a estudar o efeito do comportamento motor em moscas (8, 10, 22–24). Particularmente dois trabalhos que descobrimos recentemente foram de grande importância, pois permitiram que nós comparássemos diretamente os resultados de nossa pesquisa. Nesses trabalhos também foi registrado o H1 enquanto a mosca estava parcialmente presa. Heide (55) em colaboração com seus colegas, observaram um aumento dos spikes disparados quando a mosca tentou voar e quando o estímulo era na direção nula mas não observou grandes mudanças para um estímulo excitatório. No entanto, não fizeram o registro dos disparos espontâneos e o estímulo que ofereceram para mosca manteve a taxa de disparo sempre maior que 300 Hz, note que nossa taxa nunca alcança esse máximo.

Um outro estudo realizado por Jung (56) sugeriu que os resultados de Heide devem estar relacionados com uma saturação do sinal e por isso não indica um aumento na taxa. Os resultados obtidos nesse estudo concordam com os nossos na medida que também obteve um aumento na taxa de disparo do H1 para os disparos espontâneos quando a mosca apresenta voo em comparação com não voo e ainda relataram mudanças nas diferenças entre essas taxas para estímulos com diferentes frequências. Foram feitos ainda alguns experimentos com octopamina, um neuromodulador que parece desempenhar um papel importante na atividade motora dos insetos (57). Ocorreu um aumento na taxa de respostas similar ao que ocorre durante o voo, sugerindo que os efeitos do voo sobre as propriedades de resposta de H1 foi mimetizado pela aplicação de octopamina.

Assim, outros trabalhos tem surgido com interesse em estudar a influência do comportamento no processamento sensorial. E os resultados obtidos tem indicado que ao contrário do que por muito tempo se imaginou, essa é uma questão bastante relevante para se levar em conta também no estudo da codificação visual e particularmente, no estudo das propriedades de resposta do H1.

4 Conclusão

Com o registro da acústica das asas das moscas foi possível identificar um padrão na resposta indicando que esse sinal é modulado pela informação visual. A relação entre a resposta motora e o estímulo visual mostrou que o inseto, mesmo parcialmente preso, muda o batimento de cada asa para alterar a direção de seu voo no instante em que um estímulo visual fornecido por um monitor muda de direção.

As alterações nas asas ocorreram de maneira antifásica para um estímulo indo para uma direção e para outra. Verificamos assim que a mosca tentou voar para o lado contralateral ao deslocamento do estímulo, como ocorre em voo livre. Para isso, ela muda o comportamento da asa direita para voar para esquerda e vice-versa. Essa resposta motora regular permite que possamos inferir o movimento a ser “feito” pela mosca. Assim, o uso do registro acústico das asas muito provavelmente irá nos permitir utilizar a informação motora para controlar a imagem em tempo real em experimentos futuros com o H1. Com a mosca controlando seu voo simularíamos uma condição mais próxima à realidade na qual teríamos mais condições de propor novos experimentos que respondam questões ainda em aberto sobre o sistema visual das moscas.

Uma dessas questões, e ainda pouco estudada, foi o principal foco e motivação desse trabalho. Nosso objetivo foi verificar se a resposta do H1 muda com o comportamento de voo do inseto. Desenvolvemos para esse fim toda uma instrumentação específica que permitiu capturar as medidas do H1 com a mosca voando e parcialmente livre.

Nossos resultados mostram que o H1 sofre um considerável aumento na sua atividade quando a mosca está voando sem estímulo nenhum. Quando colocamos um estímulo notamos que o tempo de resposta a um estímulo excitatório diminui. Ainda houve um aumento na taxa para condição de voo quando o estímulo era nulo e também para um estímulo excitató-

rio, mas nesse último as taxas nas duas condições motoras voltam a ficar próximas após algum tempo.

Dessa forma podemos dizer que o H1 fica em um estado diferente e mais sensível durante voo em comparação ao comportamento quiescente. Mas o que especificamente causa a mudança na sensibilidade? Ou quais neuroquímicos estão envolvidos? Muitas perguntas ainda não foram respondidas, mas com a metodologia implementada, os aparatos desenvolvidos e os resultados preliminares alcançados temos condições de explorar mais questões e propor novos experimentos e protocolos a ser realizados para obter uma melhor ideia do que está acontecendo e contribuir cada vez mais para um aprimoramento dos experimentos com o sistema visual da mosca.

Referências

- 1 FARROW, K.; HAAG, J.; BORST, A. Input organization of multifunctional motion-sensitive neurons in the blowfly. *The Journal of Neuroscience*, v. 23, n. 30, p. 9805–9811, 2003.
- 2 FERNANDES, N. M. *Acuidade visual e codificação neural da mosca Chrysomya megacephala*. 2010, 102 p. Dissertação (Mestrado em Física Aplicada) — Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.
- 3 STRAUSFELD, N.; OBERMAYER, M. Resolution of intraneuronal and transynaptic migration of cobalt in the insect visual and central nervous systems. *Journal of Comparative Physiology*, v. 110, n. 1, p. 1–12, 1976.
- 4 ESTEVES, I. M.; FERNANDES, N. M.; KÖBERLE, R. How to take turns: the fly's way to encode and decode rotational information. 2011. Disponível em: <<http://arxiv.org/pdf/1103.0451v1.pdf>>. Acesso em: 03 julho 2013.
- 5 BORST, A.; THEUNISSEN, F. E. Information theory and neural coding. *Nature Neuroscience*, v. 2, n. 11, p. 947–957, 1999.
- 6 CHIAPPE, M. E. et al. Walking modulates speed sensitivity in drosophila motion vision. *Current Biology*, v. 20, n. 16, p. 1470–1475, 2010.
- 7 JUNG, S. N.; BORST, A.; HAAG, J. Flight activity alters velocity tuning of fly motion-sensitive neurons. *The Journal of Neuroscience*, v. 31, n. 25, p. 9231–9237, 2011.
- 8 MAIMON, G. Modulation of visual physiology by behavioral state in monkeys, mice, and flies. *Current Opinion in Neurobiology*, v. 21, n. 4, p. 559–564, 2011.
- 9 RIND, F. C.; SANTER, R. D.; WRIGHT, G. A. Arousal facilitates collision avoidance mediated by a looming sensitive visual neuron in a flying locust. *Journal of Neurophysiology*, v. 100, n. 2, p. 670–680, 2008.
- 10 ROSNER, R.; EGELHAAF, M.; WARZECHA, A.-K. Behavioural state affects motion-sensitive neurones in the fly visual system. *The Journal of Experimental Biology*, v. 213, n. 2, p. 331–338, 2010.

- 11 TREUE, S.; MAUNSELL, J. H. Attentional modulation of visual motion processing in cortical areas mt and mst. *Nature*, v. 382, p. 539-541, 1996. DOI:10.1038/382539a0.
- 12 WALLIS, T. S.; ARNOLD, D. H. Motion-induced blindness and motion streak suppression. *Current Biology*, v. 19, n. 4, p. 325-329, 2009.
- 13 POSNER, M. I.; GILBERT, C. D. Attention and primary visual cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 96, n. 6, p. 2585-2587, 1999.
- 14 MURAKAMI, M. et al. State-dependent sensory gating in olfactory cortex. *Neuron*, v. 46, n. 2, p. 285-296, 2005.
- 15 NIELL, C. M.; STRYKER, M. P. Modulation of visual responses by behavioral state in mouse visual cortex. *Neuron*, v. 65, n. 4, p. 472-479, 2010.
- 16 FORLIM, C. G. *Estudo experimental da eletrocomunicação em peixes de campo elétrico fraco da espécie Gymnotus carapo- uma aplicação da Teoria da Informação*. 2008. 38 p. Dissertação (Mestrado em Física Aplicada) — Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- 17 NELSON, M. E.; MACIVER, M. A. Prey capture in the weakly electric fish apteronotus albifrons: sensory acquisition strategies and electrosensory consequences. *Journal of Experimental Biology*, v. 202, n. 10, p. 1195-1203, 1999.
- 18 HEILIGENBERG, W.; BAKER, C.; MATSUBARA, J. The jamming avoidance response in *ineigenmannia* revisited: The structure of a neuronal democracy. *Journal of Comparative Physiology*, v. 127, n. 3, p. 267-286, 1978.
- 19 BULLOCK, T. H.; JR, R. H. H.; SCHEICH, H. The jamming avoidance response of high frequency electric fish. *Journal of Comparative Physiology*, v. 77, n. 1, p. 1-22, 1972.
- 20 BULLOCK, T. H.; BEHREND, K.; HEILIGENBERG, W. Comparison of the jamming avoidance responses in gymnotoid and gymnarchid electric fish: a case of convergent evolution of behavior and its sensory basis. *Journal of Comparative Physiology A*, v. 103, n. 1, p. 97-121, 1975.
- 21 WATANABE, A.; TAKEDA, K. The change of discharge frequency by ac stimulus in a weak electric fish. *Journal of Experimental Biology*, v. 40, n. 1, p. 57-66, 1963.
- 22 MILLER, P. Haltere activity in a flightless hippoboscid fly, *crataerina pallida*. *Journal of Insect Physiology*, v. 23, n. 7, p. 855-860, 1977.
- 23 SANDEMAN, D. C. Angular acceleration, compensatory head movements and the halteres of flies (*lucilia serricata*). *Journal of Comparative Physiology*, v. 136, n. 4, p. 361-367, 1980.

- 24 HAAG, J.; WERTZ, A.; BORST, A. Central gating of fly optomotor response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, n. 46, p. 20104–20109, 2010.
- 25 FRY, S. N. et al. Trackfly: virtual reality for a behavioral system analysis in free-flying fruit flies. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 171, n. 1, p. 110–117, 2008.
- 26 FRY, S. N.; SAYAMAN, R.; DICKINSON, M. H. The aerodynamics of hovering flight in drosophila. *Journal of Experimental Biology*, v. 208, n. 12, p. 2303–2318, 2005.
- 27 GAZZIRO, M.; ALMEIDA, L. Dual-monitor deterministic hardware for visual stimuli generation in neuroscience experiments. 2010. Disponível em: <<http://ieeexplore.ieee.org/stamp/stamp.jsp?arnumber=05626823>>. Acesso em: 3 jul. 2013.
- 28 BORST, A.; HAAG, J. Neural networks in the cockpit of the fly. *Journal of Comparative Physiology A*, v. 188, n. 6, p. 419–437, 2002.
- 29 BORST, A.; HAAG, J.; REIFF, D. F. Fly motion vision. *Annual Review of Neuroscience*, v. 33, p. 49–70, 2010.
- 30 SAFRAN, M. N. et al. Adaptation and information transmission in fly motion detection. *Journal of Neurophysiology*, v. 98, n. 6, p. 3309–3320, 2007.
- 31 HAUSEN, K. Motion sensitive interneurons in the optomotor system of the fly. *Biological Cybernetics*, v. 45, n. 2, p. 143–156, 1982.
- 32 HENGSTENBERG, R. Common visual response properties of giant vertical cells in the lobula plate of the blowflycalliphora. *Journal of Comparative Physiology*, v. 149, n. 2, p. 179–193, 1982.
- 33 KRAPP, H. G.; HENGSTENBERG, B.; HENGSTENBERG, R. Dendritic structure and receptive-field organization of optic flow processing interneurons in the fly. *Journal of Neurophysiology*, v. 79, n. 4, p. 1902–1917, 1998.
- 34 WERTZ, A. et al. Robust coding of ego-motion in descending neurons of the fly. *The Journal of Neuroscience*, v. 29, n. 47, p. 14993–15000, 2009.
- 35 HAAG, J.; BORST, A. Orientation tuning of motion-sensitive neurons shaped by vertical-horizontal network interactions. *Journal of Comparative Physiology A*, v. 189, n. 5, p. 363–370, 2003.
- 36 HAAG, J.; BORST, A. Recurrent network interactions underlying flow-field selectivity of visual interneurons. *The Journal of Neuroscience*, v. 21, n. 15, p. 5685–5692, 2001.

37 HATEREN, J. V. et al. Function and coding in the blowfly h1 neuron during naturalistic optic flow. *The Journal of Neuroscience*, v. 25, n. 17, p. 4343–4352, 2005.

38 ECKERT, H.; DVORAK, D. R. The centrifugal horizontal cells in the lobula plate of the blowfly, *phaenicia sericata*. *Journal of Insect Physiology*, v. 29, n. 7, p. 547–560, 1983.

39 TWAROG, B.; ROEDER, K. Properties of the connective tissue sheath of the cockroach abdominal nerve cord. *The Biological Bulletin*, v. 111, n. 2, p. 278–286, 1956.

40 DICKINSON, M. H.; TU, M. S. The function of dipteran flight muscle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: physiology*, v. 116, n. 3, p. 223–238, 1997.

41 NALBACH, G.; HENGSTENBERG, R. The halteres of the blowfly calliphora. *Journal of Comparative Physiology A*, v. 175, n. 6, p. 695–708, 1994.

42 DICKINSON, M. H. Haltere-mediated equilibrium reflexes of the fruit fly, *drosophila melanogaster*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: biological sciences*, v. 354, n. 1385, p. 903–916, 1999.

43 HUSTON, S. J.; KRAPP, H. G. Nonlinear integration of visual and haltere inputs in fly neck motor neurons. *The Journal of Neuroscience*, v. 29, n. 42, p. 13097–13105, 2009.

44 SHERMAN, A.; DICKINSON, M. H. Summation of visual and mechanosensory feedback in *drosophila* flight control. *Journal of Experimental Biology*, v. 207, n. 1, p. 133–142, 2004.

45 FRYE, M. A.; DICKINSON, M. H. et al. Fly flight: a model for the neural control of complex behavior. *Neuron*, v. 32, n. 3, p. 385–388, 2001.

46 HEIDE, G.; GÖTZ, K. G. Optomotor control of course and altitude in *drosophila melanogaster* is correlated with distinct activities of at least three pairs of flight steering muscles. *Journal of Experimental Biology*, v. 199, n. 8, p. 1711–1726, 1996.

47 TU, M.; DICKINSON, M. Modulation of negative work output from a steering muscle of the blowfly calliphora vicina. *Journal of Experimental Biology*, v. 192, n. 1, p. 207–224, 1994.

48 EGELHAAF, M. Visual afferences to flight steering muscles controlling optomotor responses of the fly. *Journal of Comparative Physiology A*, v. 165, n. 6, p. 719–730, 1989.

49 DICKINSON, M. H.; LEHMANN, F.-O.; GOTZ, K. The active control of wing rotation by *drosophila*. *Journal of Experimental Biology*, v. 182, n. 1, p. 173–189, 1993.

50 LEHMANN, F.; GÖTZ, K. Activation phase ensures kinematic efficacy in flight-steering muscles of *drosophila melanogaster*. *Journal of Comparative Physiology A*, v. 179, n. 3, p. 311–322, 1996.

- 51 COHEN, I. *Itai Cohen Group-research*. Disponível em: <<http://cohengroup.ccmr.cornell.edu/research.php?project=10008>>. Acesso em: 01 jul. 2013.
- 52 ALMEIDA, L. O. B. *Desenvolvimento de instrumentação eletrônica para estudos de codificações neurais no duto óptico em moscas*. 2006, 86 p. Dissertação (Mestrado em Física Aplicada) — Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.
- 53 ALMEIDA, L. O. B. *Instrumentação computacional de tempo real integrada para experimentos com o duto óptico da mosca*. 2013, 84 p. Tese (Doutorado em Física Aplicada) — Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.
- 54 GÖTZ, K. G.; HENGSTENBERG, B.; BIESINGER, R. Optomotor control of wing beat and body posture in drosophila. *Biological Cybernetics*, v. 35, n. 2, p. 101–112, 1979.
- 55 HEIDE, G. Neural mechanisms of flight control in diptera. *BIONA-report*, v. 2, p. 35–52, 1983.
- 56 JUNG, S. N. *Visual Motion Detection in Tethered Flying Flies*. 2011, 110 p. Thesis (Masters) — Biology College of Ludwig-Maximilians-Munich University, Germany, 2011.
- 57 ROEDER, T. Octopamine in invertebrates. *Progress in Neurobiology*, v. 59, n. 5, p. 533–561, 1999.