

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA TUISKON DICK  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EDUCAÇÃO EM CIÊNCIAS:  
QUÍMICA DA VIDA E SAÚDE**

*Gilvan Luiz Borba Filho*

**Desenvolvimento e utilização de equipamentos  
para estudos em neurociência para subsidiar a  
descoberta científica por alunos do ensino  
básico à pós-graduação.**

*Porto Alegre, fevereiro de 2015*

*Gilvan Luiz Borba Filho*

**Desenvolvimento e utilização de equipamentos da neurociência para subsidiar a descoberta científica por alunos do ensino básico à pós-graduação.**

Tese de Doutorado apresenta ao Programa de Pós Graduação em Educação em Ciências: Química da Vida, Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor no em Educação em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Diogo Onofre Gomes  
de Souza

**Porto Alegre, RS - 2015**

Esse projeto está vinculado ao OBSERVATÓRIO DA EDUCAÇÃO – EDITAL  
2010 - Fomento a Estudos e Pesquisas em Educação

EDITAL Nº 38/2010/CAPES/INEP

Intitulado:

“A descoberta científica e alfabetização: alguma correlação? – Uma investigação  
com alunos do 2º ano do Ensino Básico de Escolas Públicas de Porto  
Alegre/RS”

Sobre a coordenação do Prof. Dr. Diogo Onofre Gomes de Sousa.

Linha de pesquisa:

-Educação em Ciências: interação entre processos de alfabetização e da  
descoberta científica.

*A minha filha, companheira de eternas aventuras, minha  
princesa Isabel Cristina Miller Borba.*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Gilvan Luiz Borba e Josefa Iluminata de Macedo Borba por terem me apoiado durante toda a minha vida. Meu pai por ter me apresentado ao mundo científico me levando para conhecer o INPE. E minha mãe que me deu a disciplina e garra para sempre correr atrás de meus objetivos.

A Iara Miller que trilhou junto comigo por 14 anos e me deu a rosa mais preciosa da minha vida, minha filha Isabel Cristina Miller Borba e meu filho, já um homem, Fabio Miller, obrigado pelo apoio e amor incondicional, amo muito vocês.

Agradecimentos a Kamila Cagliari Zenki e Eduardo Kalinine pelo apoio, conversas, pela inestimável ajuda e momentos de descontração durante minha estadia em Porto Alegre. Ao pelo apoio, ajuda.

Ao Eduardo Rico pelos momentos de inspiração e descontração, além de horas de conversas científicas, ao Denis G., Ben Hur e Suelen por todos os momentos que tivemos e que, direto ou indiretamente, influenciaram no caminhar dessa tese.

Ao meu querido orientador Diogo Onofre que apostou em mim e me deu essa oportunidade. Muito obrigado querido professor.

A minha pequena Gheyslane Mendes que percorreu a reta final dessa jornada comigo, obrigado por me aguentar nesses momentos. Amo-te.

Obrigado a todos que fizeram parte do meu pequeno mundo, obrigado por terem feito exatamente o que fizeram, tenho certeza que se tivessem feito algo diferente o desfecho dessa história poderia ter sido diferente.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) pela estrutura e espaço disponibilizado. A todos os funcionários do Departamento de Bioquímica.

Finalmente, obrigado às agências de fomento CNPq e CAPES pela bolsa concedida.

*“Ainda é difícil convencer as pessoas de que a inovação começa na educação de base. Ciência e tecnologia começam com a criança que o cientista foi no passado”*

**Cristovam Buarque**

*“A inovação não se faz sem ciência e ciência não se faz sem educação”*

**Luiz Antônio Elias**

*“Tudo em ciência e tecnologia começa com a educação dos jovens. É preciso uma estratégia de encantamento em inovação”*

**Marcelo Gleiser**

*“Todo mundo quer falar de inovação, mas poucas pessoas entendem que inovação começa com gente, e gente para fazer inovação tem que ser educada.  
O grande gargalo da ciência brasileira é a educação brasileira”*

**Miguel Nicolelis**

## RESUMO

A ciência e tecnologia andam juntas. A ciência fornece o conhecimento para a geração de novas tecnologias que, por sua vez, disponibiliza novas ferramentas para a geração de novos conhecimentos. Uma educação científica deve vir acompanhada de uma educação tecnológica permitindo então que o aluno entenda não só o experimento, mas também como os resultados foram obtidos, como os equipamentos, técnicas e protocolos funcionam. Para uma educação científica efetiva o aluno deve ir além de expectador, se colocando no papel de pesquisador, a fim de construir seu próprio conhecimento. No entanto, para essa tarefa, é necessário o uso de equipamentos adequados ao experimento a ser realizado. Essa tese visa suprir a necessidade de equipamentos para experimentos na área de neurociência focados no estudo de memória e aprendizado, utilizando roedores e peixes como modelos animais na tarefa de esQUIVA inibitória passiva. Esses equipamentos visam uma maior acessibilidade do ponto de vista operacional e financeiro, sendo mais precisos e com isso fornecendo dados mais confiáveis e robustos do que os equipamentos disponíveis. Possibilitando aos alunos, da alfabetização à pós-graduação, a realização de experimentos comportamentais, tanto de maneira simples quanto complexas, interagindo em todas as etapas experimentais, resultando em aprendizagem e desenvolvimento cognitivo além de possibilitar novas descobertas científicas.

**Palavras-chave:** EsQUIVA inibitória passiva; aprendizado; memória; zebrafish; ratos.

**ABSTRACT**

Science and technology walking together, science provides the knowledge to generate new technologies which in turn provides new tools for the generation of new knowledge. A science education must be accompanied by a technological education to enable students to understand not only the experiment, but also how the results were obtained, understanding how the equipment, techniques and protocols work. For effective science education the student must go beyond bystander, putting themselves in the researcher function in order to construct their own knowledge. However for this task, it is necessary to use suitable equipment to the experiment to be performed. This PhD Thesis aims to fill a need for equipment for experiments in neuroscience focused on the study of memory and learning, using rodents and fish as animal models in the passive inhibitory avoidance task. These devices achieve greater accessibility of the operational and financial point, being more accurate and thus providing more reliable and consistent data than current equipment. Enabling student's literacy to post graduate conducting simple and complex behavioral experiments, interacting in all experimental steps, resulting in learning and cognitive development and enable new scientific discoveries.

**Keywords:** Passive inhibitory avoidance task; learning; memory; Zebrafish; Rats.



**LISTA DE FIGURAS E TABELAS**

**MANUSCRITO “Esquiva inibitória passiva aquática – padronização de variáveis e estudo do efeito da frequência de estímulo no aprendizado em zebrafish.”**

<b>Figura 1</b>	Variação da condutividade com o aumento da temperatura.....	11
<b>Figura 2</b>	Variação de condutividade com diluição de eletrólitos.....	12
<b>Figura 3</b>	Representação esquemática do aparato de esquiva inibitória.....	13
<b>Figura 4</b>	Linhas de campo elétrico utilizando fibras em suspensão.....	17
<b>Figura 5</b>	Linhas de campo elétrico.....	17
<b>Figura 6</b>	Variação da corrente elétrica na água do aquário.....	19
<b>Figura 7</b>	Forma de onda da corrente aplicada.....	21
<b>Figura 8</b>	Tempo de exploração dos compartimentos.....	23
<b>Figura 9</b>	Latência de entrada no treino.....	24
<b>Figura 10</b>	Latências de entrada pós treino.....	24
<b>Figura 11</b>	Aprendizado vs frequência .....	25

**ARTIGO “Um novo aparelho para a tarefa de esquiva inibitória (step-down) passiva – efeitos da baixa e alta frequência em um modelo que evita variações pela bioimpedância.”**

<b>Figura 1</b>	Representação esquemática do aparato de esquiva.....	35
<b>Figura 2</b>	Forma de onda da fase positiva do estímulo.....	36
<b>Figura 3</b>	Traçado da intensidade de corrente.....	38
<b>Figura 4</b>	Número de animais recebendo três rajadas consecutivas.....	41
<b>Figura 5</b>	Tempo de descida da plataforma.....	46
<b>Figura 6</b>	Efeitos da frequência (Hz) e da intensidade de corrente.....	48
<b>Figura 7</b>	Efeitos da frequência (Hz) em 0.35mA.....	49
<b>Figura 8</b>	Efeito da Guanosina na latência de descida da plataforma.....	51
<b>Figura 9</b>	Influência no aprendizado do tempo de exploração.....	52
<b>Tabela 1</b>	Descrição da observação comportamental.....	50

## SUMÁRIO

<b>1.Introdução.....</b>	<b>01</b>
<b>2.Objetivos.....</b>	<b>07</b>
<b>3 Esquiva inibitória passiva aquática – padronização de variáveis e estudo do efeito da frequência de estímulo no aprendizado em zebrafish (Manuscrito a ser submetido).....</b>	<b>08</b>
<b>4 Um novo aparelho para a tarefa de esquiva inibitória (step-down) passiva – efeitos da baixa e alta frequência em um modelo que evita variações pela bioimpedância( Artigo publicado na Plos One).....</b>	<b>30</b>
<b>5. Metodologia.....</b>	<b>64</b>
<b>6. Ensaio de pesquisa (proposta).....</b>	<b>65</b>
<b>7. Discussão.....</b>	<b>68</b>
<b>8.Perspectivas.....</b>	<b>71</b>

## INTRODUÇÃO

*‘What is painful is avoided and what is pleasant is pursued’.*

*Aristotle, De MotuAnimalium*

Ciência e tecnologia andam juntas desde o início da história da humanidade e para entender essa relação é necessário aprofundar o conceito de tecnologia. Longe de serem apenas os apetrechos eletrônicos que existem ao nosso redor, a tecnologia compreende todo o conjunto de instrumentos, métodos e técnicas que visam a resolução de problemas. A descoberta do fogo, a invenção da roda, da escrita e a prensa móvel são exemplos de tecnologias (primitiva e medieval).

A ciência por sua vez é todo o conhecimento adquirido pelo estudo ou prática. O avanço científico proporciona o conhecimento necessário para o desenvolvimento de novas tecnologias, já os avanços tecnológicos possibilitam o aprofundamento científico gerando novos conhecimentos.

Essa relação é uma parte fundamental de nosso mundo, no qual, para viver plenamente é necessário estar alfabetizado científica e tecnologicamente. Possuir um conhecimento científico pleno é conhecer as tecnologias envolvidas na geração daquele conhecimento. Assim, uma alfabetização científica necessita do acompanhamento de uma alfabetização tecnológica de modo a permitir a compreensão de como aquele conhecimento foi gerado.

Autores como Krasilchik, Delizoicov, Piaget (Delizoicov, 1990; Krasilchik, 2004; Piaget, 1980) defendem a necessidade de uma formação científica de base na sociedade atual, de uma exposição a um ambiente rico e diversificado. No entanto, uma das principais limitações impostas atualmente

em relação às atividades experimentais em sala de aula é que elas apenas comprovam as teorias pré-concebidas de conceitos científicos o que, de acordo com Zanon e Silva, pouco contribui para uma aprendizagem significativa (Zanon, 2000).

Nessa linha o Dr. Glaucius Oliva (presidente do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq – 2012) defende que o ideal seria que o estudante fosse “*empreendedor do seu próprio conhecimento, da sua própria formação*”, adotando uma atitude que incentive o pensamento livre e desperte o interesse pelo conhecimento.

De acordo com o neurocientista Dr. Miguel Nicolelis “*A gente não faz um sistema para que as crianças gostem de estudar, para que vão à esquina jogar bola e, no intervalo, discutam o que Newton fez, ou por que a Teoria da Relatividade mudou o mundo. Precisamos de um modelo replicável e só pode ser replicável se a prática da ciência de alto nível for massificada. Isso só vai acontecer por outro modelo educacional, não um modelo para educar servidores, ou servos, mas para educar mentes livres do receio de ousar*”.

Para tanto é necessário que as escolas levem a ciência às crianças, jovens e adultos, de modo que eles adquiram a capacidade de gerar conhecimentos e não o ato de adquirir um conhecimento acabado. Proporcionando a capacidade de aprender a solucionar problemas e questionar o mundo em sua volta se tornando aptos a aplicar um conjunto de normas básicas que devem ser seguidas para a produção de conhecimentos (método científico).

Dessa forma, o aluno necessita de conhecimentos prévios fornecidos pelo educador para iniciar uma observação sistemática de fatos, uma educação tecnológica que o permita seguir para a realização das experiências sabendo como as técnicas e aparelhos funcionam, para finalmente, com o uso de deduções lógicas, comprovar cientificamente os resultados obtidos.

Não existe um momento bem definido para se iniciar a educação científica e tecnológica. No entanto, o processo de alfabetização escolar inicia-se em torno dos 6/7 anos de idade em virtude de achados já bem consolidados em psicologia cognitiva que mostram que nessa fase as estruturas cerebrais já atingiram a maturidade necessária para esse tipo de aprendizagem. Nessa fase o indivíduo já se encontra apto a fazer relações entre objetos cognitivos de representação concreta (Sternberg, 2000). Assim, ele é capaz de compreender experimentos científicos que não envolvam conceitos abstratos, sendo esse aprendizado um estímulo para o desenvolvimento de suas estruturas cognitivas.

A exposição a esse tipo de estímulo (experimentos científicos) poderia não só favorecer o desenvolvimento de conhecimentos em ciência, mas também melhorar globalmente a capacidade de aprendizagem, como, por exemplo, a alfabetização.

Estudos com humanos indicam que a aprendizagem nas crianças ocorra em meio prazeroso e motivadores. A participação em experimentos científicos pode incentivar a reflexão sobre os temas propostos, estimulando cognitivamente os alunos e otimizando a aprendizagem escolar através do interesse pelo conhecimento – ou seja, motivando-os.

No ensino de ciências nas séries iniciais, os trabalhos de Carvalho e seus colaboradores, vêm mostrando o quanto é significativo para as crianças o desenvolvimento de atividades experimentais. Com estudos fortemente apoiados na perspectiva de Piaget, os trabalhos vêm mostrando as importâncias de tais atividades para a construção do conhecimento. As pesquisas desenvolvidas por Carvalho com a utilização de atividades experimentais, mostraram que para discutir os conceitos e fenômenos decorrentes das ciências naturais é necessário buscar tais conceitos no cotidiano dessas crianças, em suas brincadeiras, em seu mundo. Assim, a tarefa da escola passa a ser a reconstrução desses conceitos que

já estão elaborados de forma espontânea no mundo vivenciado por elas. Destaca a autora, que *“é importante fazer com que as crianças discutam os fenômenos que as cercam”*, levando-as a estruturar esses conhecimentos e a construir, com seu referencial lógico significados dessa parte da realidade.

Conforme Bachelard, *“todo conhecimento é resposta a uma questão”* (Bachelard, 1938), o que nos permite ressaltar a das atividades experimentais no processo de (re)construção de conhecimentos científicos para as séries iniciais, conforme destacou Carvalho (Carvalho and Costa, 1998). A experimentação não pode ser relegada a um segundo plano nas séries iniciais, pois é da natureza da criança experimentar, testar, investigar e propor soluções, cabendo a escola incentivar e usufruir destas características, atuando como mediadora entre a experimentação espontânea e a científica. *“Esta abordagem metodológica enfatiza a iniciativa do aluno porque cria oportunidade para que ele defenda suas ideias com segurança e aprenda a respeitar as idéias dos colegas. Dá-lhes também a chance de desenvolver variados tipos de ações – manipulações, observações, reflexões, discussões e escrita”*(Carvalho, 1998).

Na prática, a experimentação, quando presente nas atividades curriculares, assume o caráter de demonstração, de comprovação dos conceitos e fenômenos discutidos teoricamente, ou ainda, acaba sendo empregada como recurso estratégico para manter a atenção do estudante no objeto de conhecimento. Entretanto, é necessário ultrapassar esta visão e redirecionar as atividades experimentais, tendo em vista que *“a principal função das experiências é, com a ajuda do professor e a partir das hipóteses e conhecimentos anteriores, ampliar o conhecimento do aluno sobre os fenômenos naturais e fazer com que ele as relacione com sua maneira de ver o mundo”*. (Ibid, p.20).

Astolfi et al, mostram que o ensino de ciências para crianças, representa a introdução à formação do espírito científico, que pressupõe iniciação à dedução,

ao raciocínio lógico, mas também representa a inventividade das hipóteses e à formulação de problemas. O ensino de ciência não deve visar apenas os conhecimentos dos conceitos e fenômenos específicos da disciplina, como também deve ser entendido como *“uma alavanca preciosa para o desenvolvimento da passagem à abstração, das capacidades de raciocínio e de antecipação, favorecendo o acesso a novas operações mentais”* (Astolfi, 1998)

Para Hodson, as atividades experimentais ainda têm por objetivo estimular a confiança e a autoestima dos alunos, sendo indiferente ao resultado final do experimento, o importante é a participação dos alunos, a tentativa (Hodson, 1988).

O desenvolvimento e a utilização de equipamentos de neurociências para serem usados por alunos, jovens e adultos, podem ter um papel estimulador no campo do ensino e aprendizagem. Por outro lado, os equipamentos atuais disponíveis no mercado voltados à neurociência possuem um custo elevado, o que inviabiliza a sua aquisição pelas escolas, além de serem de difícil manuseio devido a sua complexidade operacional. Surge, então, uma necessidade de desenvolvimento de equipamentos que proporcionem aos alunos as ferramentas necessárias para estimular a vivência do método científico, possuindo um fácil manuseio e baixo custo, mas mantendo suas características funcionais. Através desses equipamentos e dos experimentos em neurociências, esperamos minimizar a falta de interesse dos alunos por aprender (Peroneo, 2008).

De acordo com Piaget a interação entre o sujeito e objeto resulta em aprendizagem e desenvolvimento cognitivo, assim mais do que observadores, esse projeto propõe colocar as crianças no papel de pesquisadores, interagindo diretamente com os equipamentos aqui desenvolvidos, de forma que eles possam ditar o ritmo dos experimentos de acordo com a busca dos seus saberes (Piaget, 1990).



Essa tese visa suprir a necessidade de equipamentos para experimentos na área de neurociência focados no estudo de memória e aprendizado, utilizando roedores e peixes como modelos animais na tarefa de esquiva inibitória passiva, para serem utilizados por alunos, da alfabetização à pós-graduação.

Além disso, a introdução dos alunos nesse ambiente de equipamentos tecnológicos e experimentos científicos pode facilitar a construção de conhecimentos naturais (Delizoicov, 1990).

### **Referências (Introdução)**

Astolfi J-PP, Brigitte; Vérin, Anne. Como as crianças aprendem as ciências. Lisboa, Portugal: Instituto Piaget., 1998: 103.

Bachelard G. La Formation de l'esprit scientifique. Contribution a\0300 une psychanalyse de la connaissance objective. Paris, 1938.

Carvalho AMPd. Ciências no Ensino Fundamental: o conhecimento físico. São Paulo: Scipione,, 1998: 20.

Carvalho VMdA, Costa VRd. Cientistas do Brasil : depoimentos. Sociedade Brasileira para o Progresso da Cie\0302ncia: Sa\0303o Paulo, SP, 1998.

Delizoicov. Metodologia do Ensino de Ciências. São Paulo: Cortez, 1990.

Hodson D. Experiments in science teaching. Educational Philosophy and Theory, 1988.

Krasilchik M. Prática de ensino de biologia. 4. ed. São Paulo: Edusp,, 2004.

Peroneo DdS. Algumas Reflexões sobre o Ensino e a Aprendizagem de Ciências nos Anos Iniciais. Programa de Pós-Graduação em Educação em Ciências: Química da Vida e Saúde/UFRGS 2008.

Piaget J. Epistemologia Genética São Paulo: Martins Fontes, 1990.

Piaget J. Experiments in contradiction. University of Chicago Press: Chicago, 1980.

Sternberg RJ. Pathways to psychology, 2nd ed. ed. Harcourt College Publishers: Fort Worth, TX ; London, 2000.

Zanon LBS, L. H. A. . A experimentação no ensino de ciências. São Paulo:Capas/Unimep, 2000.

## **2. OBJETIVO GERAL.**

Disponibilizar equipamentos para que alunos dos anos iniciais do ensino fundamental possam ter contato com as neurociências, desenvolvendo a capacidade de abstração, transposição do conhecimento adquirido e o desenvolvimento pensamento crítico. Para isso é necessário desenvolver equipamentos para pesquisa em neurociência robustos e acessíveis de modo a viabilizar a vivência do método científico por crianças em processo de alfabetização e o desenvolvimento de pesquisas e novos experimentos por alunos da graduação e pós-graduação.

### **2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

**2.1.1.** Projetar e construir os instrumentos que viabilizem experimentos para pesquisa em neurociência na área de memória e aprendizado aversivo:

-Introdução do conceito de corrente elétrica e materiais condutivos através de experimentos e observações realizadas pelos próprios alunos.

-Introdução ao conceito de memória e aprendizado em modelos animais através de experimentos de esquiva inibitória.

**2.1.2.** Adaptar o protocolo de esquiva inibitória, com os equipamentos desenvolvidos, de modo a adequá-los para o uso dos alunos no laboratório.

- Analisar a influência do uso dos equipamentos desenvolvidos na capacidade de abstração e generalização, avaliar a capacidade de transposição do conhecimento adquirido da observação do experimento.

-Avaliar a influência desses experimentos na taxa de alfabetização (através do aumento motivacional) comparando com as taxas históricas de turma controle das mesmas escolas.

**2.1.3.** Divulgar os resultados da pesquisa na comunidade escolar e sociedade em geral e na comunidade científica.

### **3. Manuscrito a ser submetido para a revista Plos Biology**

#### **Esquiva inibitória passiva aquática – padronização de variáveis e estudo do efeito da frequência de estímulo no aprendizado aversivo em zebrafish**

##### **Abstract**

**BACKGROUND:** A tarefa de esquiva inibitória vem sido amplamente utilizada para o estudo da memória aversiva. Nos últimos anos começou a se utilizar o zebrafish como modelo animal, mas parâmetros cruciais inerentes aos aparelhos atuais que podem influenciar na análise comportamental (frequência do estímulo, condutância da água, distribuição dos eletrodos) são frequentemente negligenciados.

**NOVO METODO:** Desenvolvemos um novo aparato para a tarefa de esquiva inibitória aquática, modificando a forma e distribuição dos eletrodos de aço inox no aquário. Cada par forma um dipolo elétrico cuja polaridade é invertida de um pulso elétrico para o outro. Esse dispositivo dispõe de componentes que

medem e registram a corrente exata fornecida ao animal, com um controle preciso da frequência do estímulo aplicada durante todo o experimento.

**RESULTADOS:** Diferente dos dispositivos atuais, esse novo aparato aumenta a área de contato entre os eletrodos e a água. Padronizamos a condutividade da água para que junto com a distribuição das barras, resulte em uma drástica redução da influência do tamanho do animal. É importante ressaltar que a memória aversiva foi observada em estímulos com intensidades e frequências específicas..

**CONCLUSÃO:** Esse novo aparelho oferece uma melhora substancial na análise comportamental na tarefa de esquiva inibitória com zebrafish, permitindo a comparação de dados entre animais com diferentes idades e tamanhos.

## **Introdução**

Nos últimos anos diversos trabalhos foram desenvolvidos para o estudo de memória utilizando como modelo animal o zebrafish (Capiotti et al., 2014; Fernandes et al., 2015; Luchiari et al., 2015; Miklosi and Andrew, 2006; Salas et al., 2006), dentre as formas de avaliação do aprendizado e memória destaca-se a utilização do método de esquiva inibitória (Blank et al., 2009; Bortolotto et al., 2015; de Castro et al., 2009; Manuel et al., 2015; Ng et al., 2012), seguindo a linha de estudo que foi consolidada no modelo com roedores (Borba Filho et al., 2015; de Oliveira Alvares et al., 2005; Detrait et al., 2009; Hudson, 1950; Izquierdo et al., 1999). No entanto, ao levarmos o modelo de esquiva inibitória do modelo com roedores para o modelo com peixes alguns cuidados devem ser tomados, com o intuito de permitir a repetitividade do experimento e sua replicabilidade em outros laboratórios. Esse artigo visa à análise de como as diversas variáveis envolvidas no processo de esquiva inibitória aquática, com

zebrafish, podem sofrer variações e como estão relacionadas entre si, além disso apresentamos algumas sugestões de como resolver alguns dos problemas encontrados no decorrer dos experimentos de esquiva inibitória, utilizando como modelo animal o zebrafish.

Para o estudo de memória, com modelos animais, empregando um estímulo aversivo é necessário que, primeiramente, o animal sinta o estímulo e que o mesmo se mostre homogêneo para o mesmo grupo e igual ou proporcional dentro dos grupos a serem comparados.

Nesse modelo de esquiva inibitória, a corrente elétrica é fornecida por meio de barras metálicas que servem de condutores para a transmissão da corrente, da fonte para o animal. No caso da utilização de peixes como modelo animal temos a introdução de novas variáveis, (condutividade da água, distribuição da corrente elétrica na água e as características físicas do animal) uma vez que teremos a água como condutor da corrente da fonte para o animal.

## **Materiais e métodos**

### **Animais e condições experimentais**

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com a lei Brasileira 11.794/2008. Recomendações para o bem estar do animal foram seguidas de acordo com o projeto aprovado ao comitê de ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul #28043. Peixes zebrafish (4 meses , 0.4g, n=125) foram utilizados nesse presente estudo. Animais foram mantidos sob temperatura controlada ( $22^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) em uma sala com ciclo 12h claro/ 12h escuro, ph xx , densidade de xx peixes/litro. Antes do experimento, os animais foram isolados em baias individuais fig3-D, 24 horas antes do inicio do treino até o termino do experimento com alimentação controlada 2 vezes ao dia. A

habituação dos animais para o experimento é um ponto crítico, uma vez que diminui o estresse causado pelo manipulador no dia do treino e pelo isolamento do cardume. Após o período de habituação, os animais são treinados no aparato de esquiva inibitória entre as uma e cinco horas da tarde. O desempenho comportamental do animal é registrado em vídeo.

## Água

A água utilizada para a tarefa de esquiva inibitória passiva aquática foi a água de osmose reversa com adição de sal marinho até atingir a condutividade de  $500\mu\text{S}/\text{cm}$  a uma temperatura de  $27^\circ\text{C}$ , pH 6.8. Esse é um dos pontos críticos do experimento, uma vez que o tipo de água a ser utilizada influencia na transmissão da corrente que vai passar para o peixe, ou seja, no estímulo sentido pelo peixe e a temperatura da água modifica sua condutividade conforme a figura 1 (ElgaLabwater).

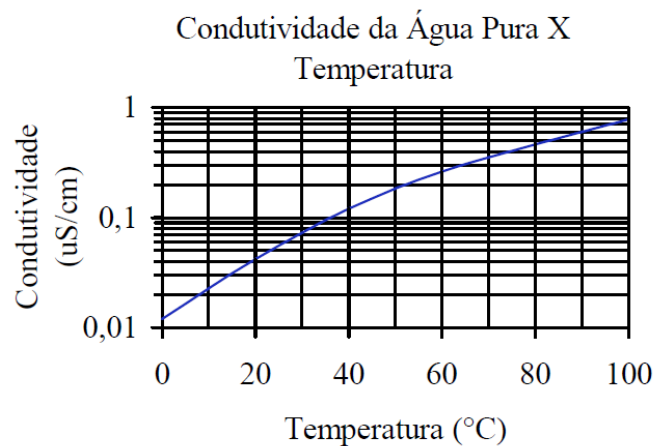
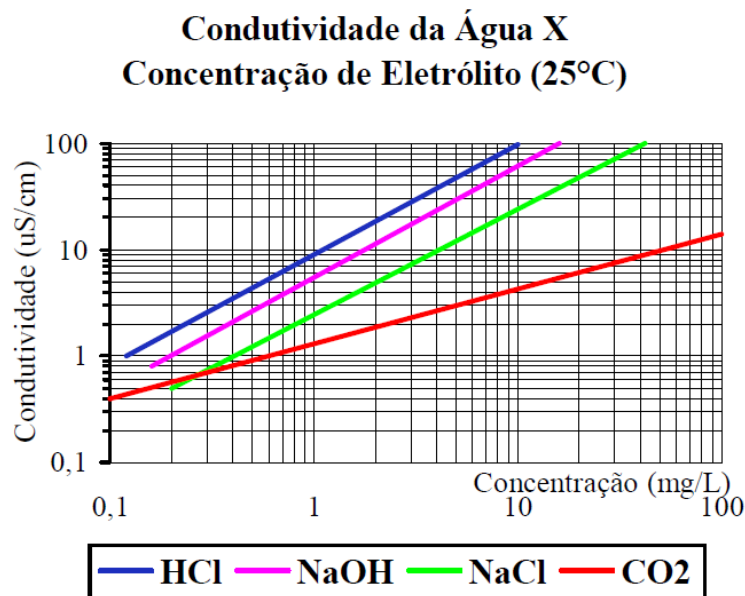


Figura 1 Gráfico fornecido pela Elga Labwater (ElgaLabwaterElgaLabwater) mostrando a variação da condutividade da água tipo 1 com o aumento da temperatura

Na definição de qual tipo de água utilizar deve-se observar como cada variável influencia na transmissão da corrente elétrica para o peixe, o primeiro

fator é a temperatura, isso porque um aumento de 1°C pode causar um aumento na condutividade da água tipo 2 de 2% e de até 6% na água tipo 1, fig1. Já o pH da água tipo 1 pode cair até 4,5 devido a absorção de CO<sub>2</sub> da atmosfera, assim uma das primeiras limitações desse modelo fica em torno de como a temperatura e o pH vão ser controladas no decorrer do experimento.

A diferença de condutividade entre os tipos de água deve-se a diluição de íons nas mesmas, esse fenômeno foi mostrado por August Arrhenius em seu trabalho “Dissociação das substâncias Aquosas” publicado em 1889 (Arrhenius, 1889). Nele, Arrhenius estabelece a teoria da dissociação iônica, onde a condutividade elétrica das soluções devia-se à existência de íons livres. Esse processo é facilmente observado na diluição de NaCl em água, o qual sofre uma dissociação formando os íons Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>, para essa solução Arrhenius deu o termo de solução eletrolítica. Mesmo a água tipo 1 obtida por osmose reversa ou desionização não atinge a marca de zero de condutância, isso ocorre porque a água sofre auto ionização formando o cátion hidrogênio e hidroxila.



**Figura 2** Gráfico fornecido pela Elga- Labwater mostrando a variação de condutividade da água tipo 1 frente a diluição de diferentes quantidades e tipos de eletrólitos

Sendo assim, quanto maior a quantidade de íons livres diluídos na água, maior vai ser a sua condutividade, fig2(ElgaLabwater). Isso influencia diretamente a distribuição da corrente elétrica pela água e a passagem da mesma pelo peixe.

### Aparato de esquia inibitória

O aparato de esquia inibitória aquática passiva consiste em um aquário de dimensões 30x10x15cm de vidro revestido por uma camada de filme branco. Nas laterais do aquário estão dispostos 6 pares de barras de aço inoxidável de 1,2cm de largura. No centro do aquário temos uma porta móvel de fibra de vidro branca e nos extremos um sistema de iluminação com possibilidade de seleção entre três cores pré definidas (vermelho, verde e branco). Fig 3 A.

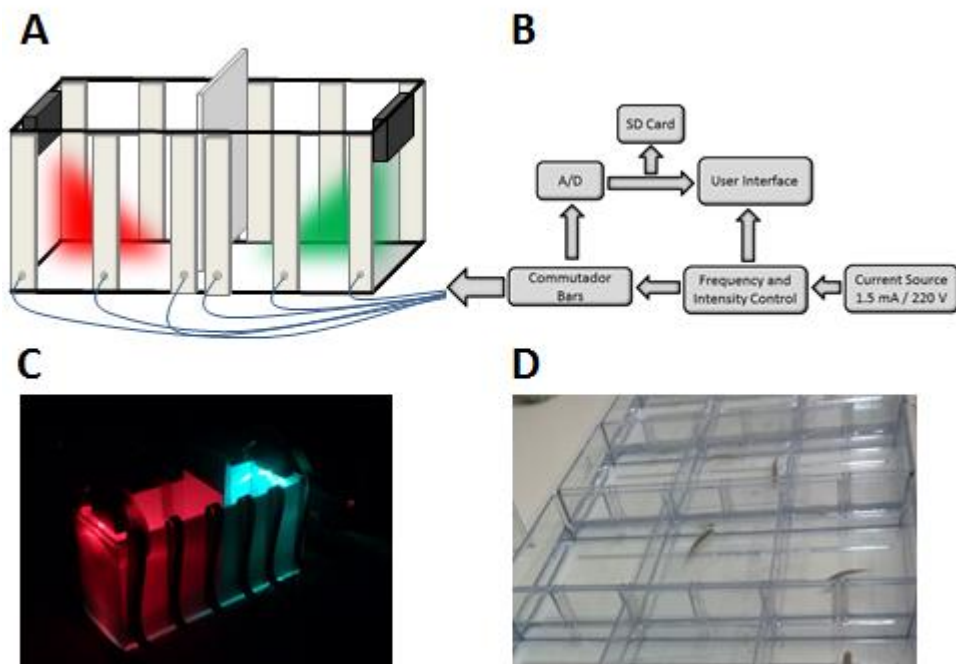


Figura 3 Representação esquemática do aparato de esquia inibitória - O aparato de esquia inibitória – A; o diagrama operacional com o controlador digital de frequência pelo microcontrolador (PIC18F4520) –B; foto do aparelho em uso –C ; baias individuais D.



O sistema de controle da corrente elétrica conta com um microcontrolador para controle da frequência do estímulo, seleção de cores e permutação das barras durante o estímulo fig3-B.

### **Corrente elétrica na esquia**

A corrente elétrica é distribuída entre a água e o peixe, sendo que a corrente elétrica ( $i$ ) é definida como a razão entre o movimento de cargas ( $Q$ ) passando em um determinado ponto ou plano.

$$i = \frac{dQ}{dt}$$

Essa definição, no entanto, não é suficiente para analisar o que ocorre no peixe, necessitando a utilização do conceito de densidade de corrente  $J$ , que é definida por.

$$J = \rho v$$

Onde  $\rho$  é a densidade volumétrica de cargas e  $v$  é a velocidade média de movimento das cargas por um plano  $S$ . Podemos então escrever a corrente elétrica  $i$  como fruto da multiplicação da densidade de corrente  $J$  pela área, ou seja:

$$i = \oint_S J dS$$

Consideraremos que a densidade de cargas,  $\rho$ , e a velocidade,  $v$ , na água a ser utilizada sejam constantes, teremos que  $J$  será constante e podemos escrever que:

$$i = J \oint_S dS$$

A transmissão da corrente elétrica da fonte da esquiva inibitória para a água é fornecida por meio de eletrodos imersos na água (a distribuição da corrente entre os eletrodos na água será vista mais adiante). Após sair dos eletrodos, a corrente se espalha pela água, e ao colocarmos o peixe na água temos que parte da corrente continuará passando pela água e parte começará a passar pelo peixe. Desse modo, podemos dizer que a corrente  $i$  será dada pelo somatório da densidade de corrente da água,  $J_a$ , pela área da coluna de água acima e abaixo do peixe,  $S_a$ , com a densidade de corrente no peixe,  $J_p$ , pela área do mesmo,  $S_p$ .

$$i = J_a \oint_{S_a} dS + J_p \oint_{S_p} dS$$

Sendo a corrente  $i$ , fornecida pela fonte da esquiva inibitória constante, temos que a parcela que passará pelo peixe será função da densidade de corrente do peixe,  $J_p$ , ou seja, da densidade de cargas livres no interior do animal, pela velocidade de locomoção das mesmas, no seu interior, multiplicada pela área do peixe. Podemos considerar que a densidade de cargas no interior dos peixes da mesma espécie vivendo sobre condições iguais de osmolaridade e alimentação é constante para o grupo, assim teremos a influência da área do animal e da densidade de cargas na água assim como da área da coluna de água acima e abaixo do peixe.

## **Eletrodos**

Nos artigos que abordaram a esquiva inibitória utilizando o zebrafish como modelo animal, os eletrodos são colocados em um dos lados do aquário,

sendo um fio nu na extremidade do aquário (Blank et al., 2009) ou na forma de uma placa tomando metade do aquário (Ng et al., 2012).

Ambos os modelos apresentam certa limitação, do ponto de vista de otimização da esquiva, ao optar por uma placa ao longo do aquário a área de superfície que é dada por:

$$A = \oint_S dS$$

No caso de uma barra retangular,  $A = B.H$ , onde  $B$  é o comprimento da base da placa e  $H$  é a altura da mesma.

Essa área (superfície da placa) será muito maior que a área do peixe, dessa forma, a densidade de corrente da água deve ser menor que a densidade de corrente do peixe, a fim de compensar a diferença das áreas. Isso é feito colocando uma água de baixa condutividade, normalmente água tipo 1, mas optar por esse tipo de água acarreta problemas como um pH que pode sofrer variações bruscas e uma necessidade de um controle fino na temperatura da água e uma limpeza constante do aquário entre os animais a fim de manter a água em seu nível de pureza.

Ao utilizar um fio nu como eletrodos resolveram o problema da área, mas criamos outro, a distribuição do campo elétrico na água seguirá as linhas do campo magnético caindo com o quadrado da distância e o cosseno entre a linha dos eletrodos e a linha do campo elétrico.

A visualização da distribuição das linhas de força do campo elétrico pode ser observada na elegante demonstração feita pelo Mr. Harold M Waage, do Laboratório de Física Palmer, na Universidade de Princeton, cuja foto encontra-se impressa no livro “Curso de Física de Berkeley – eletricidade e magnetismo” de 1970 (Waage, 1970) e pode ser vista abaixo, fig4.

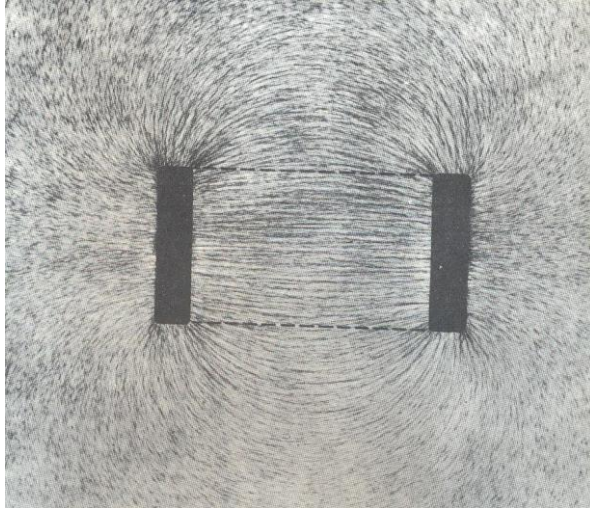


Figura 4 Demonstração das linhas de campo elétrico utilizando fibras em suspensão no óleo. (H. M. Waage, Am. J. Phys. 32, 388 (1964))

Podemos calcular a corrente elétrica por meio do campo elétrico. Os eletrodos imersos na água formam um dipolo cujo campo elétrico pode ser expresso por:

$$E = \frac{-2Q}{r^2 + h^2} \cos\theta$$

Onde  $r$  é a distância à linha central entre os dois eletrodos,  $h$  é a metade da distância entre os eletrodos e  $\theta$  é o ângulo entre a linha central entre os dois eletrodos e a distância  $r$  e  $Q$  é a carga nos eletrodos. fig 4.

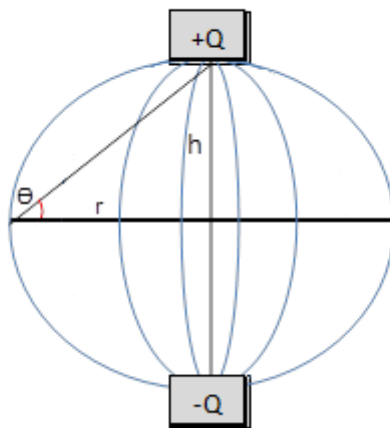


Figura 5 Linhas de campo elétrico fluindo do polo positivo para o negativo.

A partir do campo elétrico  $E$  podemos calcular a intensidade de corrente, uma vez que:

$$J = \sigma \cdot E$$

Assim.

$$J = \frac{-2Q}{r^2 + h^2} \cdot \sigma \cdot \cos\theta$$

Onde  $\sigma$  é a condutividade do material, medido em ohms por metro ou siemens por cm. Logo, quanto mais distante da linha dos eletrodos, mais fraco fica o campo elétrico e menor a densidade de corrente  $J$ . Dessa forma, passamos a ter um valor de corrente variável ao longo do aquário. Essa variação foi medida utilizando 1 litro de água tipo 2 (fig 6-A) em um aquário com dimensões 30cmx10cm, com os eletrodos colocados na extremidade do aquário, utilizando barras com 1,2cm de largura como eletrodos e uma barra a mesma forma e material utilizada como eletrodo para medição da corrente ao longo da água do aquário, aplicando uma corrente  $i$  de  $0.7\mu\text{A}$ , o resultado da medição pode ser visto na figura 6.

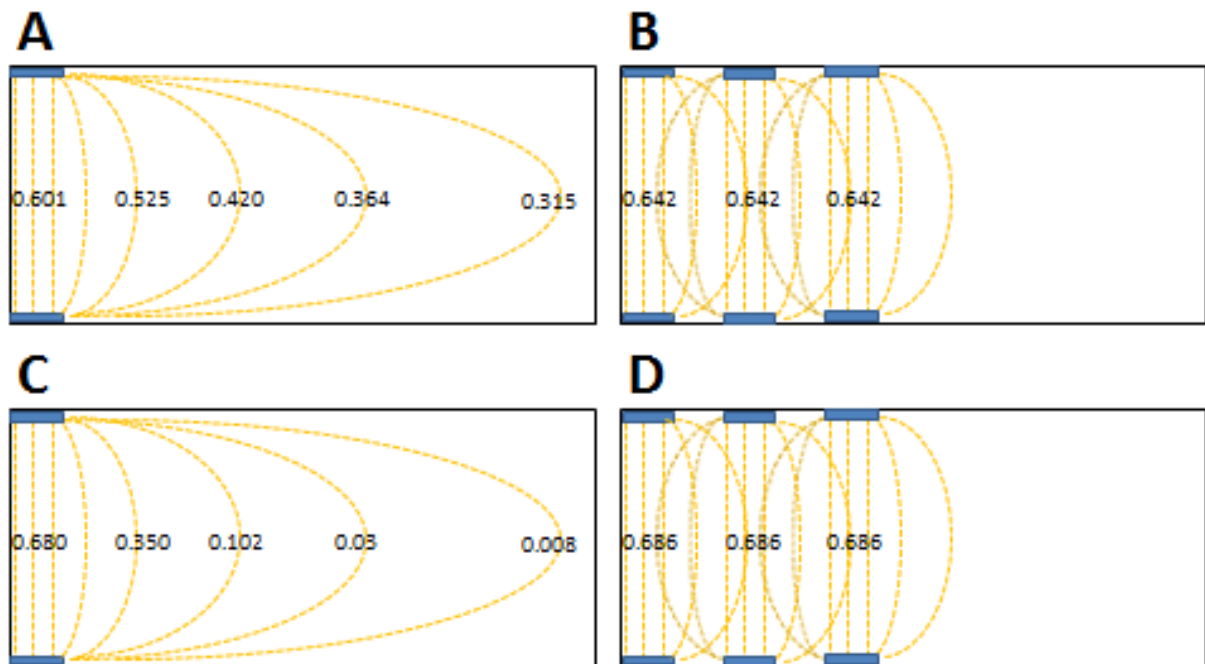


Figura 6 Variação da corrente elétrica na água do aquário, corrente aplicada de 0.7mA. A - água tipo 2 , um único bar de eletrodos; B - água tipo 2, 3 pares de eletrodos; C- água de osmose com adição de sal marinho, condutividade 500uS/cm, um par de eletrodos; D- água de osmose com adição de sal marinho, 500uS/cm, 3 pares de eletrodos.

Para a medição das correntes na água do aquário foi utilizado o multímetro ET-2082C da Minipa, precisão de  $\pm 1,1\%$ .

Para resolver esse problema evitando o aumento demasiado na área dos condutores, foram colocados seis pares de eletrodos retangulares, com 1.2cm de base. Os eletrodos foram colocados nas paredes ao longo do aquário para limitar a superfície de contato lateral das barras com a água, fig6-B-D. A configuração adotada permite a seleção dos pares que serão utilizados para o fornecimento do estímulo aversivo. Os pares selecionados são ligados alternadamente à uma frequência até 126Hz com alternância entre os polos.

## Frequências

Ao se introduzir uma fonte de tensão em uma solução eletrolítica que estava em repouso, as cargas livres na solução entram rapidamente em movimento, dando origem a corrente elétrica. Porém, com o fluxo de cargas temos uma diminuição da densidade de cargas  $\rho$  e por consequente, uma diminuição do fluxo de corrente  $J$ .

A diminuição das cargas segue uma relação exponencial que pode ser obtida utilizando a lei de Ohm, a equação da continuidade e nelas aplicando a primeira equação de Maxwell. Assim chega-se a seguinte equação:

$$\rho = \rho_0 \cdot e^{-(\sigma/\epsilon).t}$$

Onde  $\epsilon$  é a permissividade dada pela permissividade relativa do material  $\epsilon_r$  multiplicada pela permissividade do vácuo  $\epsilon_0$ . Essa relação nos dá uma queda da densidade de cargas pela constante de tempo  $\epsilon/\sigma$  que é chamada de tempo de relaxação. No caso da água tipo 2 temos que :

$$\frac{\epsilon}{\sigma} = \frac{80 \cdot 8,854 \cdot 10^{-12}}{1 \cdot 10^{-6}} = 0,7ms$$

$$\rho = \rho_0 \cdot e^{-(t/0,7ms)}$$

Ou seja, em 0,84 milisegundos toda carga livre no interior da água tipo 2 é reduzida em 30%, após 6 milisegundos as cargas livres no interior da água tipo 2 são reduzidas a 0,01% da carga inicial.

Para evitar a variação de densidade de cargas e consequente mudança no valor do estímulo recebido pelo animal, a corrente elétrica é fornecida na forma de pulsos quadrados e alternados, fig 7.

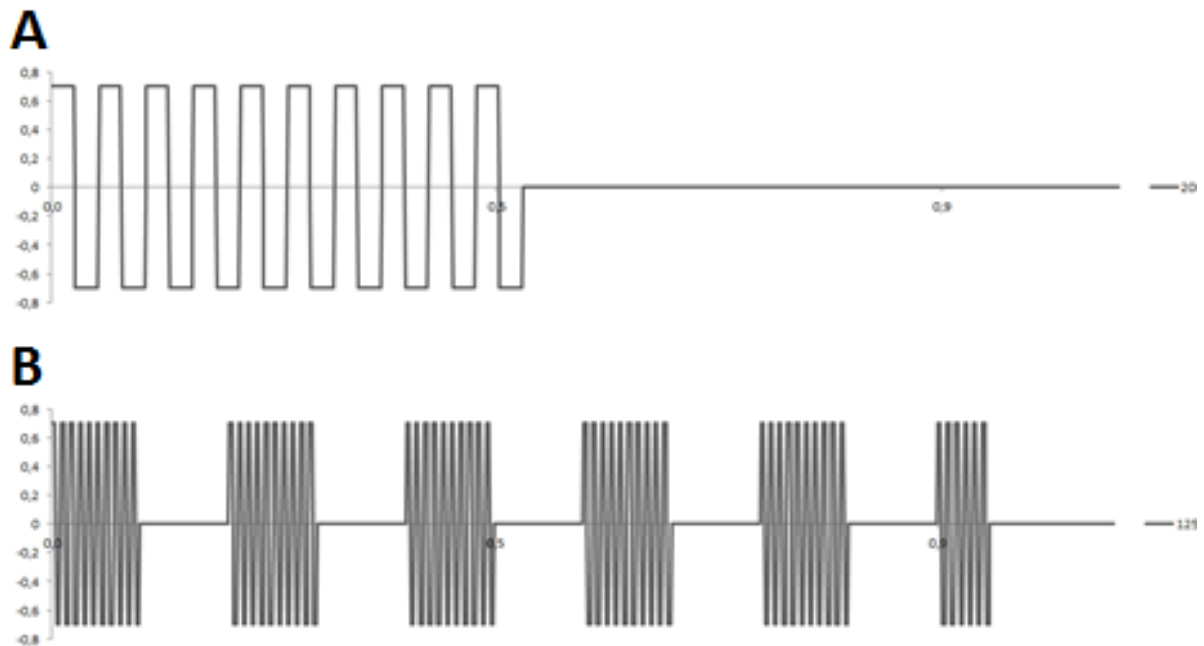


Figura 7 Forma de onda da corrente aplicada. A- 20 Hz10 pulsos de 25ms a cada 500ms ; B- 125Hz10 pulsos de 4ms a cada 83ms.

### Tarefa de esquiva inibitória passiva

Após o condicionamento em baias individuais, os animais são submetidos ao treino no aparato de esquiva inibitória. Com a porta central fechada, o animal é colocado em um dos dois compartimentos do aquário, já com a iluminação devidamente ligada, sendo o tempo de habituação no compartimento de 60s. Após esse tempo a porta central é elevada cerca de 2cm, e logo após cruzar para o compartimento oposto o animal recebe o estímulo até retornar ao compartimento inicial. O tempo total do treino é de 2 minutos pós-tempo de habituação, onde durante esse tempo o animal recebe o estímulo elétrico sempre que entra no compartimento oposto, possuindo limite de entradas de 10 vezes.

No final do treino o animal é recolocado na baia individual e reposto ao aparato 24h depois, sessão de teste.



Tanto na sessão de treino quanto na sessão de teste, o tempo de latência para a entrada do animal no compartimento oposto é medido via ativação de um cronometro manual.

### **Análises estáticas**

Os dados foram expressos em mediana e intervalo interquartil, uma vez que as variáveis analisadas (latência de entrada no compartimento aversivo no dia da seção de teste e treino) não seguem uma distribuição normal, utilizando o teste de normalidade D'Agostino&Pearson. A observação teve um limite de 180 segundos e os dados foram analisados usando o programa Graphpad Prism 5. Para comparação de resultados foi empregado ANOVA de uma via seguido por Dunnett's, Mann-Whitney ou usando Chi-square com nível de significância de  $p < 0.05$ .

### **Resultados**

Para eliminar a influencia da preferencia por um compartimento ou outro, foram utilizadas duas cores neutras, vermelho e verde, para diferenciar o compartimento aversivo do compartimento seguro. Não foi observada diferenças significativas no tempo de exploração dos animais nos compartimentos ao longo de 10 minutos, fig 8.

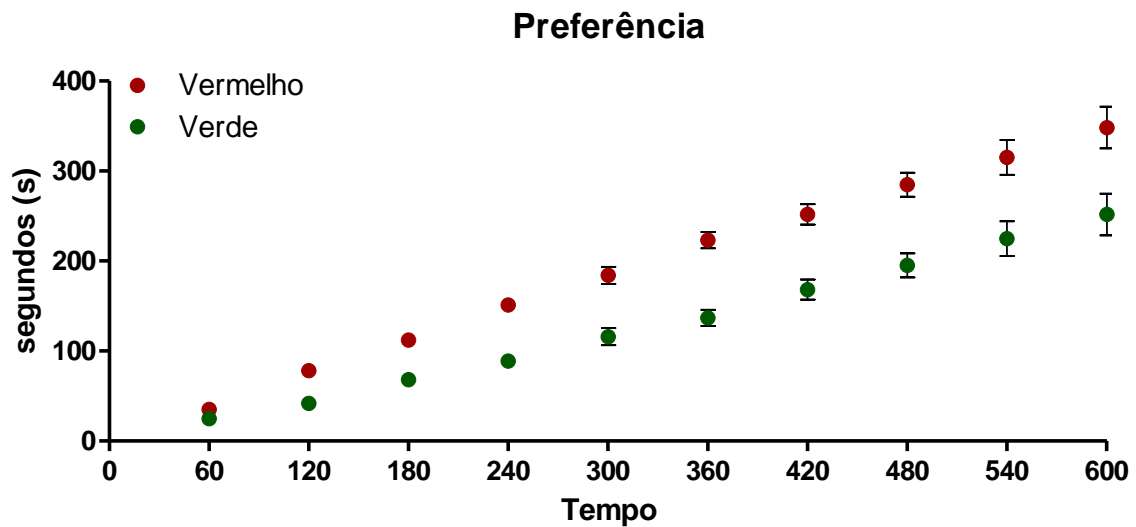


Figura 8 Tempo de exploração dos compartimentos, deixo y valor do tempo em cada compartimento (valor acumulativo) n=10/ grupo; média e erro.

A influência da cor do compartimento aversivo foi observada no tempo de latência inicial para a entrada no compartimento aversivo e no número de estímulos (trials) que o animal leva ao longo dos 2 minutos de treino, fig.9.

Quando o compartimento aversivo possui a cor vermelha o animal demora menos tempo para atravessar a divisória do aquário (latencie- training) quando comparado ao tempo médio para a entrada no compartimento aversivo quando este é iluminado com a cor verde. O número de estímulos elétricos que o animal leva ao longo de 2 minutos é significativamente maior quando o compartimento aversivo é iluminado com vermelho.

Não foi observada diferença estatística tanto no aprendizado de curta duração (3 horas) quanto no de longa duração (24 horas) dos animais quando submetidos a 0.7mA 20Hz ou 125Hz, independente do compartimento aversivo ser na cor verde quanto na cor vermelha, fig. 10. Tendo os quatro grupos apresentado diferença estatística quando comparado às latências no teste e treino,  $p < 0.05$ .

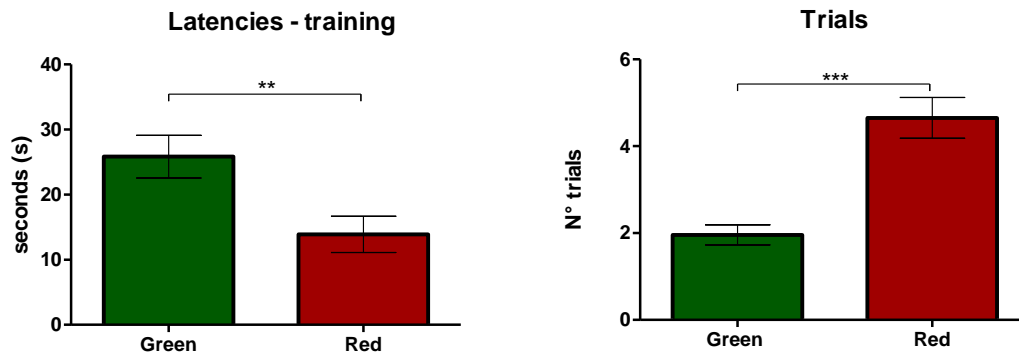


Figura 9 Latência de entrada no compartimento aversivo de acordo com a cor de iluminação do compartimento e o número de estímulos que o animal recebe ao longo do treino de acordo com a cor do compartimento em que o estímulo é dado; n=15/grupo, intensidade de estímulo 0.7mA 20Hz. Média e erro. \*\*p<0.005; \*\*\*p<0.0001.

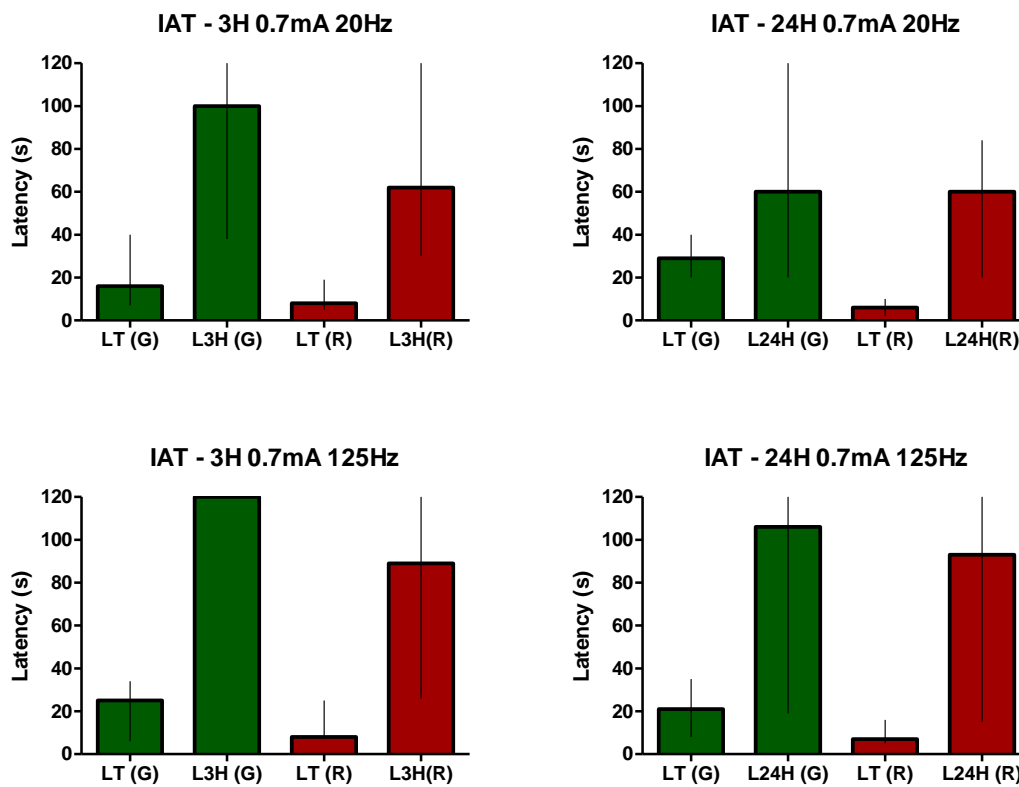


Figura 10 Latências de entrada no compartimento aversivo no dia do treino (LT) e teste 3 horas pós treino (L3) e 24 horas pós treino (L24H) de acordo com a cor do compartimento aversivo; n=15/grupo; mediana e intervalo interquartil.

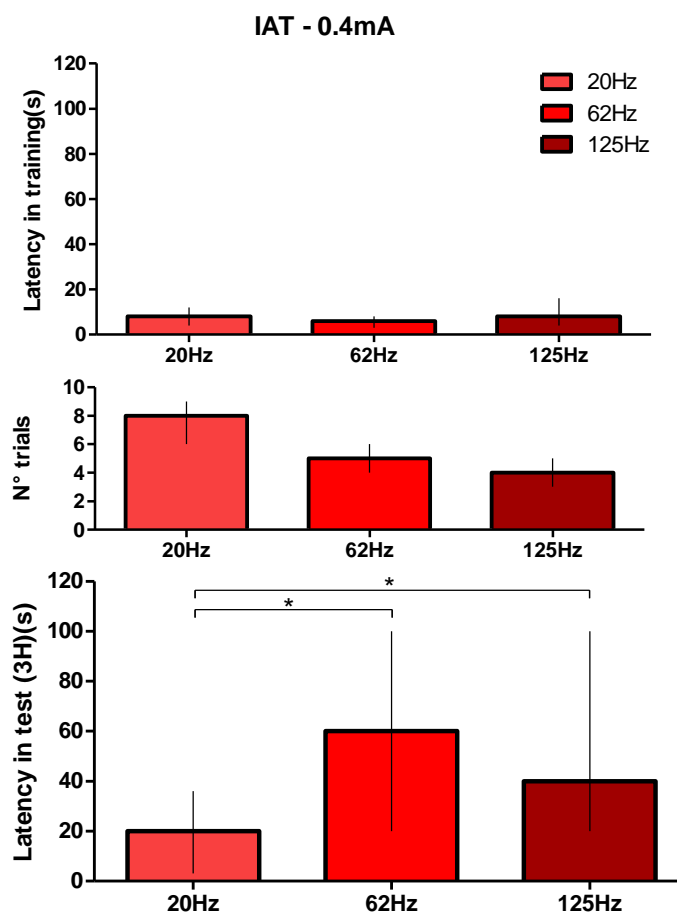


Figura 11 Latências de entrada no compartimento aversivo (vermelho) no treino e teste, número de estímulos dados no decorrer do treino , ambos em função da frequência da corrente aplicada,  $i=0.4\text{mA}$ .  $n=15/\text{grupo}$ ; mediana e intervalo interquartil;  $*p<0.05$ .

Foi observado uma diferença no aprendizado em função da frequência do estímulo aplicado para a intensidade de  $0.4\text{mA}$ . A frequência de  $20\text{Hz}$  foi menos eficaz para a geração de um compartimento de esQUIVA passiva quando comparado as frequências de  $62$  e  $125\text{Hz}$ . Fig 11.

## Discussão

Utilizando roedores como modelo, a intensidade da corrente que passa pelo corpo do animal deve ser a mesma para todos do mesmo grupo, a fim de

possuir uma resposta de acordo com o estímulo e as condições dadas pelo experimentador. Nesse modelo, a corrente elétrica é fornecida por meio de barras metálicas que servem de condutores para a transmissão da corrente da fonte para o animal. No caso da utilização de peixes como modelo animal temos a introdução de novas variáveis, uma vez que teremos a água como condutor da corrente da fonte para o animal.

Dessa forma, precisamos definir que tipo de água utilizar. Existem diversos órgãos de regulamentação que ditam os parâmetros, condutância, pH, entre outros, de cada tipo de água. A International Organization for Standardization (ISO) determina em sua norma ISO3696:1987 que a condutividade da água tipo 1 deve ser inferior a  $0.1 \mu\text{S}/\text{cm}$  e a da tipo 2  $1 \mu\text{S}/\text{cm}$  ambas a temperatura de  $25^\circ\text{C}$ , já a medição do valor do pH desses dois tipos de água não deve ser aplicado. A American Society for Testing Materials (ASTM) adota, para a temperatura de  $25^\circ\text{C}$  que a condutância da água tipo 1 deve ser inferior a  $0.056 \mu\text{S}/\text{cm}$  e a do tipo 2  $1 \mu\text{S}/\text{cm}$ , novamente a medição do pH não se aplica a esses dois tipos de água. A água de um aquário normal tem a condutância acima de  $6 \mu\text{S}/\text{cm}$  e o pH fica entre 6,5 e 8.

Colocando uma água com uma quantidade muito grande de cargas iônicas, a passagem da corrente é facilitada e uma grande parte da mesma continuará fluindo pela água. Como a densidade de cargas média do peixe é pequena, assim como sua área, a parcela de corrente que passa pelo animal pode não ser suficiente para provocar um estímulo aversivo a ponto de o animal evitar a região do choque em um teste posterior de memória.

Assim, a volta do animal a zona do aquário que deveria ser evitada não se deve ao fato do animal não ter aprendido, e sim ao fato do estímulo dado não ter sido aversivo a ponto de provocar uma memória que o faça evitar aquela região.

Desse modo, a comparação entre os animais deve ser feita levando em consideração o tamanho do animal (quanto maior o peixe maior será a área de superfície e maior a parcela de corrente que fluirá por ele), e o tipo da água utilizada. Na utilização de águas com baixa densidade de cargas iônicas a troca da água entre os animais se mostra indispensável, uma vez que o animal leva um pouco da solução da água na qual estava e o mesmo pode excretar dejetos que vão modificar a qualidade da água no aparato.

Ao utilizar uma água com maior condutividade o efeito do tamanho do animal diminui e não existe a necessidade de troca constante de água. A aplicação de uma corrente alternada homogeniza o valor do estímulo durante todo o teste, sendo também possível a modulação do aprendizado pela frequência da corrente, em baixas frequências é necessário à aplicação de uma corrente mais elevada o que pode causar a perda de postura do animal, em altas frequências (acima de 200Hz) o nado do animal é prejudicado e ele apresenta dificuldade em sair do compartimento aversivo.

Esse trabalho procurou abordar as principais variáveis envolvidas na tarefa de esquiva inibitória aquática, visando diminuir a variabilidade entre os experimentos e abordando variáveis até então negligenciadas como a frequência do estímulo, forma e distribuição dos eletrodos na água e o tipo da água a ser utilizado.

## **Referências**

- Arrhenius A. Dissociação das substâncias Aquosas. 1889.  
Blank M, Guerim LD, Cordeiro RF, Vianna MR. A one-trial inhibitory avoidance task to zebrafish: rapid acquisition of an NMDA-dependent long-term memory. *Neurobiology of learning and memory*, 2009; 92: 529-34.

Borba Filho GL, Zenki KC, Kalinine E, Baggio S, Pettenuzzo L, Zimmer ER, Weis SN, Calcagnotto ME, Onofre de Souza D. A New Device for Step-Down Inhibitory Avoidance Task-Effects of Low and High Frequency in a Novel Device for Passive Inhibitory Avoidance Task That Avoids Bioimpedance Variations. *PloS one*, 2015; 10: e0116000.

Bortolotto JW, de Melo GM, Cognato Gde P, Vianna MR, Bonan CD. Modulation of adenosine signaling prevents scopolamine-induced cognitive impairment in zebrafish. *Neurobiology of learning and memory*, 2015; 118: 113-9.

Capiotti KM, De Moraes DA, Menezes FP, Kist LW, Bogo MR, Da Silva RS. Hyperglycemia induces memory impairment linked to increased acetylcholinesterase activity in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural brain research*, 2014; 274: 319-25.

de Castro MR, Lima JV, de Freitas DP, Valente Rde S, Dummer NS, de Aguiar RB, dos Santos LC, Marins LF, Geracitano LA, Monserrat JM, Barros DM. Behavioral and neurotoxic effects of arsenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*, Teleostei: Cyprinidae). *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP*, 2009; 150: 337-42.

de Oliveira Alvares L, de Oliveira LF, Camboim C, Diehl F, Genro BP, Lanziotti VB, Quillfeldt JA. Amnestic effect of intrahippocampal AM251, a CB1-selective blocker, in the inhibitory avoidance, but not in the open field habituation task, in rats. *Neurobiology of learning and memory*, 2005; 83: 119-24.

Detrait ER, Hanon E, Dardenne B, Lamberty Y. The inhibitory avoidance test optimized for discovery of cognitive enhancers. *Behavior research methods*, 2009; 41: 805-11.

ElgaLabwater. [www.elgalabwater.com](http://www.elgalabwater.com).

Fernandes Y, Talpos A, Gerlai R. Towards the characterization of short-term memory of zebrafish: effect of fixed versus random reward location. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 2015; 56: 189-95.

Hudson BB. One-trial learning in the domestic rat. *Genetic psychology monographs*, 1950; 41: 99-145.

Izquierdo I, Medina JH, Vianna MR, Izquierdo LA, Barros DM. Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behavioural brain research*, 1999; 103: 1-11.

Luchiari AC, Salajan DC, Gerlai R. Acute and chronic alcohol administration: Effects on performance of zebrafish in a latent learning task. *Behavioural brain research*, 2015; 282: 76-83.

Manuel R, Gorissen M, Stokkermans M, Zethof J, Ebbesson LO, Vis HV, Flik G, Bos RV. The Effects of Environmental Enrichment and Age-Related Differences on Inhibitory Avoidance in Zebrafish (*Danio rerio* Hamilton). *Zebrafish*, 2015.

Miklosi A, Andrew RJ. The zebrafish as a model for behavioral studies. *Zebrafish*, 2006; 3: 227-34.

Ng MC, Hsu CP, Wu YJ, Wu SY, Yang YL, Lu KT. Effect of MK-801-induced impairment of inhibitory avoidance learning in zebrafish via inactivation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in telencephalon. *Fish physiology and biochemistry*, 2012; 38: 1099-106.

Salas C, Broglio C, Duran E, Gomez A, Ocana FM, Jimenez-Moya F, Rodriguez F.

Neuropsychology of learning and memory in teleost fish. *Zebrafish*, 2006; 3: 157-71.

Waage HM. *Curso de Física de Berkeley – eletricidade e magnetismo*. 1970.



**4- Tradução do artigo publicado na Plos One no dia 23 de fevereiro 2015  
(Anexo 1)**

**Um novo aparelho para a tarefa de esquiva inibitória (step-down) passiva –  
efeitos da baixa e alta frequência em um modelo que evita variações pela  
bioimpedância.**

Gilvan Luiz [Borba Filho]1\*, Kamila [Cagliari Zenki]2, Eduardo Kalinine2,4, Suelen Baggio2, Letícia Pettenuzzo2, Eduardo [Rigon Zimmer]2, Simone [Nardin Weis]2, Maria Elisa [Calcagnotto]2,3 and Diogo [Onofre de Souza]1,2,3.

1Programa de Pós-Graduação em Educação em Ciências, ICBS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

2Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Bioquímica, ICBS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

3Departamento de Bioquímica, ICBS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

4Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, Brasil

**Correspondence to:**

\*Gilvan Borba Filho (eng.gilvan@gmail.com)

Departamento de Bioquímica, PPG em Educação em Ciências

ICBS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rua Ramiro Barcelos 2600- Anexo

Porto Alegre, Brasil, 90035-003

Phone: +55 51 33085559

Fax: +55 51 33085540

**Abstract**

**BACKGROUND :** A tarefa de esquiva inibitória vem sido amplamente utilizada para o estudo da memória aversiva, mas parâmetros cruciais inerentes aos aparelhos tradicionais que podem influenciar na análise comportamental ( frequência do estímulo, bioimpedância do animal) são frequentemente negligenciados.

**NOVO METODO:** Desenvolvemos um novo aparato para a tarefa de esquiva inibitória passiva, modificando a forma e distribuição das barras de aço inox no piso da caixa onde o estímulo é aplicado. As barras possuem 2mm de diâmetro, são retangulares e distribuídas em pares com um espaço de 1cm até o próximo par. Cada par forma um dipolo elétrico cuja polaridade é invertida de um pulso elétrico para o outro. Esse dispositivo dispõe de componentes que medem e registram a corrente exata recebida pela pata do animal, com um controle preciso da frequência do estímulo aplicada durante todo o experimento.

**RESULTADOS:** Diferente dos dispositivos tradicionais, esse novo aparato aumenta a área de contato entre a pata e as barras, permitindo que a corrente passe apenas pelas patas do animal, drasticamente reduzindo a influencia da bioimpedância do animal. A análise dos dados gravados mostra que a corrente recebida pelo animal é praticamente a mesma aplicada, independente da composição corporal do animal. É importante ressaltar que a memória aversiva foi observada em estímulos com intensidades e frequências específicas (0.35mA ou 0.5mA a 62 e 125Hz mas não com 0.2mA ou 20Hz). Além disso, esse aparelho permite observar os bens conhecidos efeitos na memória induzidos pela guanosina.

**CONCLUSÃO:** Esse novo aparelho oferece uma melhora substancial na analise comportamental na tarefa de esquiva inibitória, permitindo a comparação de dados entre animais com diferentes composições corporais.

Keywords:

Step-down inhibitory avoidance task; Inhibitory Avoidance apparatus; Current Frequency; Learning; Bioimpedance.

## **Introdução**

No último século vários aparatos e protocolos para o estudo da memória e aprendizado vem sendo criados. Um desses aparatos foi desenvolvido por Thorndike [1], consistindo em um pequeno cesto ou “caixa de problemas”. Em meados de 1930, a tarefa foi realizada em uma caixa contendo uma alavanca e um dispensador de comida. Nesse dispositivo, o rato tem acesso à comida ao mover a alavanca [2]. Mais tarde Hudson e colaboradores [3] apresentaram um novo protocolo de estímulo único denominado tarefa de esquiva inibitória (Inhibitory Avoidance Task – IAT). Em 1960, Jarvik e Kopp [4] modificaram a IAT construindo um novo aparato contendo dois compartimentos, uma pequena e iluminada câmara conectada a uma câmara maior e escura onde o animal recebia um estímulo elétrico ao entrar. Desde então o protocolo da IAT vem sofrendo modificações. Essas modificações resultaram no consolidado protocolo de esquiva inibitória (passiva) atual.

Na tarefa de esquiva inibitória, um ponto crítico é a aplicação de várias intensidades de correntes elétricas, partindo de 0.3mA a 3mA [17-20]. A intensidade do estímulo reflete na latência de descida (step-down) no dia do teste (24h após o treino). Para ratos Wistar machos (idade, 2-3 meses, peso 220-260g), pesquisadores mostraram que a latência de descida no dia do teste é de  $\pm 40-50$  segundos para um estímulo de 0.3mA [7], 0.4mA [15,21] e 0.5mA [22-26] por 2 segundos; latências de descidas de 180 segundos no teste, aplicando 0.8mA (2s) no treino [22,27] e 600s para 1mA (2s) [28].

No entanto, esses aparelhos não consideram a influência da bioimpedância do animal na corrente aplicada. Adicionalmente, inúmeras outras versões do protocolo combinam uma ou duas seções de exposição ao estímulo (trial) durante o treino[21]. Além disso, até agora não existe uma padronização do protocolo de IAT para avaliar a memória aversiva de forma precisa [29], principalmente para novos pesquisadores na área.

Nosso objetivo foi desenvolver e padronizar um novo aparato para a tarefa de esquiva inibitória passiva, onde a intensidade da corrente aplicada nas patas do animal é precisamente a mesma em todos os animais, independente da bioimpedância do animal; a frequência do estímulo e a intensidade são controladas e registradas durante todo o experimento. Em outras intervenções, nos testamos esse novo dispositivo de esquiva inibitória passiva usando uma droga amnésica bem conhecida (guanosine, i.p) [30,31]

## **Materiais e métodos**

### **Animais e condições experimentais**

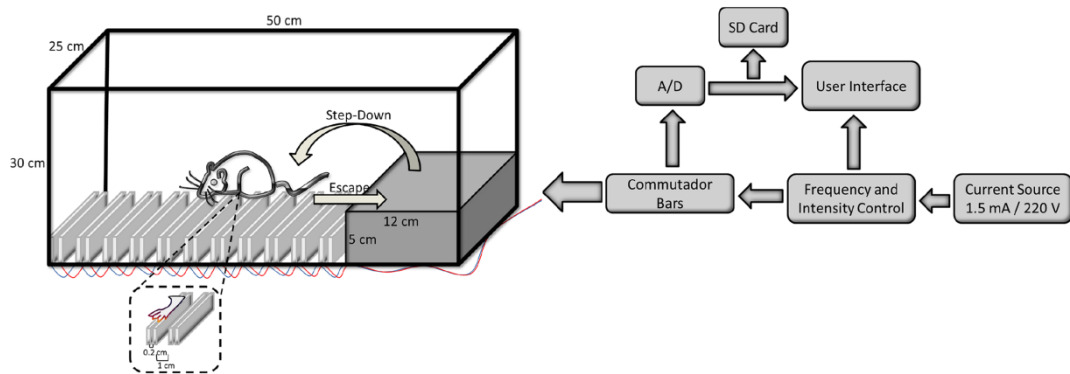
Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com a lei Brasileira 11.794/2008. Recomendações para o bem estar do animal foram seguidas de acordo com o projeto aprovado ao comitê de ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul #5647. Ratos adultos Wistar fêmeas (3 meses, 280-300g, n=20) e machos (3-5 meses, 310-450g, n= 258) foram utilizados nesse presente estudo. Animais foram mantidos sob temperatura controlada ( $22^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) em uma sala com ciclo 12h claro/ 12h escuro, além de distribuídos em grupos de 5 animais em gaiolas de plástico (plexiglas) com livre acesso a comida e água. Antes do experimento os animais foram manipulados utilizando luvas, por aproximadamente 5min, uma vez por dia durante 7 dias consecutivos.

A habituação dos animais para o experimento é um ponto crítico, uma vez que diminui o estresse causado pelo manipulador no dia do treino. Após o período de habituação, os animais são treinados no apatado de esquiva inibitória entre as 3 e 5h da tarde. A performance comportamental do animal é registrada em vídeo.

Dois protocolos de paradigmas distintos foram utilizados: no primeiro, a duração do choque nas patas foi estipulado em 3s [26,30,32] adaptando a frequência e a corrente aplicada; no segundo, os animais recebem o choque nas patas até retornar à plataforma[20]. Os parâmetros de tempo, incluindo a latência para descida com as quatro patas durante as seções de treino e sessão de teste foram medidos através de cronometro de ativação manual.

### **Aparato de esquiva inibitória**

O aparato de esquiva inibitória consiste em uma caixa de polimetil-acrilado de 50x25x30cm. Essa caixa possui uma janela de acrílico transparente de 48x30cm, no interior apresenta uma plataforma de 5cm de altura por 12cm de comprimento por 25cm de largura, seguido por uma grade formada por uma série de 20 pares de barras de aço inox (2mm de diâmetro) espaçado em 2mm entre as barras e 1cm entre cada par (Figura 1).

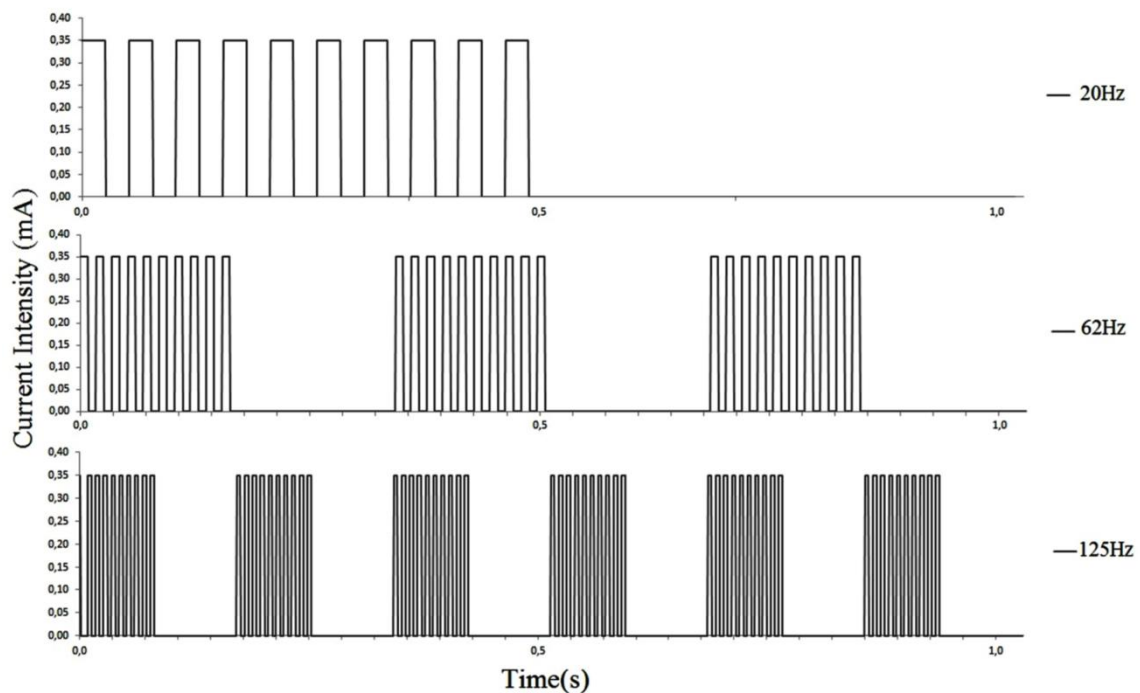


**Figura 1** Representação esquemática do aparato de esquia inibitória - O aparato de esquia inibitória, incluindo o diagrama operacional com o controlador digital de frequência pelo microcontrolador (PIC18F4520), um conversor analógico digital (A/D) para registro e controle da intensidade do estímulo e registro dos dados em um cartão SD.

Cada par de barra forma um dipolo elétrico cuja polaridade é invertida a cada pulso. Todas as barras são isoladas dos lados e embaixo. Esse aparato de esquia inibitória passiva foi construído de forma a evitar a interferência da bioimpedância dos animais na intensidade do estímulo. Com uma nova distribuição e formato das barras, a corrente passa apenas pela pata do animal que está em contato com o par de barras. Isso nos permite controlar a frequência e intensidade da corrente, além de permitir o registro da corrente que passa pela pata do animal durante todo o experimento.

## Frequências

Três frequências diferentes de correntes foram aplicadas, como mostra a figura 2.



**Figura 2** Forma de onda da fase positiva do estímulo para diferentes frequências (Hz) a intensidade de corrente 0.35 mA

Trens de pulsos a 20Hz (10 pulsos de 25ms a cada 500ms), 62Hz (10 pulsos de 8ms a cada 167 ms) e 125Hz (10 pulsos de 4ms a cada 83ms). Deste modo, o período de choque aplicado em todas as frequências selecionadas, em 1 segundo, é o mesmo. Programando a frequência da corrente, introduzimos uma frequência modulante, que expõe o animal a trens de pulsos seguidos em períodos sem choque, isso evita que o animal tenha contrações musculares contínuas involuntárias provocadas pela passagem da corrente e permite que o animal escape.

A escolha da frequência foi baseada nas frequências utilizadas em máquinas de estimulação elétrica utilizadas na fisioterapia, que propõe o uso de 10-100Hz [33]. A frequência de 10Hz foi usada por Garin[20] e o valor da frequência na maioria dos artigos que usam o aparato de esQUIVA inibitória não é especificado.

Essas frequências são controladas por um microcontrolador PIC18F4520. A intensidade do estímulo varia de acordo com o protocolo utilizado e é especificado pela voltagem recebida por um resistor de 100ohms integrado a um circuito IAT. Essa voltagem é convertida por um A/D do microcontrolador PIC18F4520 com 10bits de resolução, de acordo com o teorema da amostragem de Nyquist-Shannon, convertido em um número ASCII e registrado em um arquivo.txt em um cartão de memória SD (2Gb), usando a biblioteca fat16 para C++.

## **Bioimpedância**

Esse é um importante aspecto a ser considerado quando é usado o aparelho de esquivia inibitória. A fonte de tensão é normalmente 110V ou 220V e uma resistência é selecionada através de um botão seletor. O uso da corrente proveniente de baterias pode ser utilizado, no entanto, resulta em uma alta influencia da bioimpedância do animal [34]. De acordo com a lei de Ohm, a bioimpedância diminui a corrente efetiva recebida pelo animal quando esse toca nas barras [35]. Existem três fatores importantes que influenciam no valor da bioimpedância (usando uma frequência abaixo de 1kHz): o valor da condutividade do corpo do animal ( $\rho$ ), a área de contato entre a pata do animal e as barras de aço (A) e a distancia entre as barras (L). Em frequências abaixo de 1kHz o valor da bioimpedância é igual a resistência do corpo  $R=\rho.L/A$ [36]. Substancialmente, aumentamos a área (de 0.2cm<sup>2</sup> para 0.8cm<sup>2</sup>), modificando a forma das barras e diminuimos a distancia (de ~15cm para 0.2cm) entre os polos positivos e negativo. Como resultado de nossas modificações, esse dispositivo apresenta uma grande área (A) e pequeno percurso (L), resultando em uma



diminuição drástica do valor de bioimpedância da pele da pata do animal [37] de 1.7Mohms para 32Kohms.

No aparelho tradicional a bioimpedância da pele é de 1.7Mohms/1mm<sup>2</sup> que é um valor muito próximo ao da resistência interna da fonte de corrente para 1mA [37], além do mais, a bioimpedância do animal muda conforme a composição corporal [38]. Esse é um aspecto não especificado por vários autores [3,20,30,39,40]. De fato, medimos o valor da intensidade de corrente no aparato de esquiiva inibitória tradicional, com a base formada por tubos de por aço inox (1mm diâmetro) espaçados em 1cm [41,42]. A corrente efetiva recebida pelas patas dos animais no aparelho tradicional é normalmente reduzida em 21-58% da corrente selecionada quando as patas tocam as barras (Figura 3, gráfico inserido).

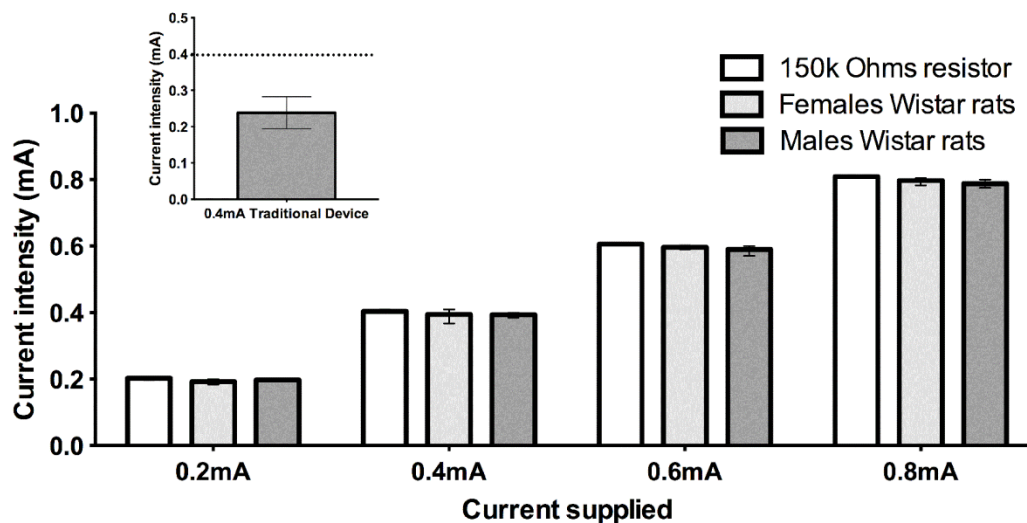


Figura 3 Traçado da intensidade de corrente a 62Hz passando através das patas dos animais ou do resistor. Diferentes grupos estão representador por barras brancas, cinzas ou cinza escuro: resistor de 150Kohms (sem animal no aparato), ratos fêmeas (3 meses ; 280-320g) ou ratos machos ( 3 meses; 310-360g), respectivamente. No gráfico inserido o efeito da corrente passando pelo corpo do animal no aparelho tradicional de esquiiva inibitória, corrente nominal de 0.4mA. O gráfico representa média e desvio. A análise por teste Mann-Whitney; n=5 animais/grupo/corrente e 5 medidas para cada animal. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. Gráfico inserido, 8 animais, 3 medidas para cada animal.

Em outras palavras, um pesquisador pode selecionar 0.5mA no aparelho tradicional e aplicar 0.25-0.4mA, mas não tem escolha na intensidade, apresentando uma alta variação nos resultados finais.

No nosso aparelho de esquiva inibitória há um aumento de 0.8cm<sup>2</sup> na área de contato entre a pata do animal e o par de barras e uma diminuição do percurso da corrente, conseqüentemente, nos diminuimos drasticamente o valor da bioimpedância da pele da pata [37] de 1.7Mohms para 32Kohms. Devido a essas mudanças, fomos capazes de reduzir a corrente de 21-58% (aparelho tradicional) para 0.1-3%.

Para o choque elétrico passar apenas pelas patas e não pelo corpo do animal no nosso aparato, existem três modos de posição das barras: conectado a fase, conectado a terra e off (sem fase, sem terra). Ligamos o par de barras (um por um) conectando apenas uma barra a fase e apenas uma barra a terra de cada vez, todas as outras barras no off. O par de barras está perto suficiente para tocar (com uma pata) as duas barras ao mesmo tempo (barra positiva e terra), assim a corrente passa da barra positiva para a barra negativa pela pata do animal e não pelo corpo inteiro como acontece no aparelho tradicional (Lei de Gauss).

### **Registro da corrente**

Deve ser observado que, além da bioimpedância, a condutividade elétrica também depende de “fatores extracorpóreos”, assim como outras impurezas que podem ficar entre as barras e patas (fezes, etc.), outro fator difícil de quantificar. Essa é a razão para medir e registrar a corrente que passa pelo animal, se qualquer fator extracorpóreo diminuir a intensidade de corrente ela vai ser visualizada.

A corrente é registrada pelo conversor analógico digital (A/D), seguindo o teorema de Nyquist-Shannon. A frequente amostragem é de 400Hz. Medimos a corrente através do valor da voltagem em um resistor de 100ohms localizado após a barra polo negativo, assim a corrente será registrada apenas quando a pata do animal fechar o circuito pisando no par de barras. O valor medido ( $V_2$ ) é resultante da tensão aplicada ( $V_1$ ) dividido pelo somatório das resistências, do botão seletor ( $R_1$ ), da bioimpedância da pata do animal ( $R_2$ ) e do resistor de 100ohms ( $R_3$ ), multiplicado por 100ohms (veja a equação abaixo).

$$V_2 = \frac{R_3 V_1}{(R_1 + R_2 + R_3)} \text{ (eq 1)}$$

Esse valor é convertido para ASCII pelo microcontrolador e registrado no cartão de memória.

Usando o sistema de registro, somos capazes de determinar o número de estímulos recebido por cada animal. A figura 4 mostra os dados da intensidade de estímulo para 0.35mA e 0.8mA em trens de 62Hz.

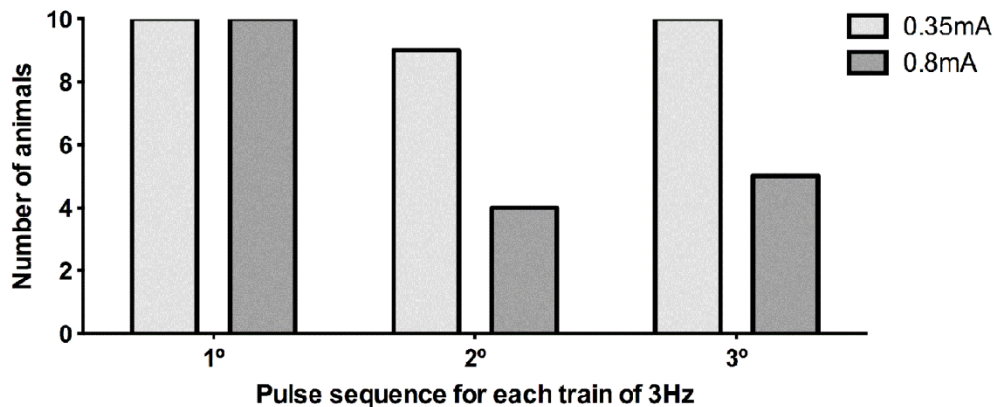


Figura 4 Número de animais (n=10 por grupo) recebendo três rajadas consecutivas de correntes (0.35mA ou 0.8mA, 62Hz), medidas em 1 segundo.

Quando a intensidade de estímulo é de 0.35mA com trens de 62Hz ou 125Hz, todos os animais recebem os pulsos dados, sem pular. No entanto, com a intensidade de estímulo de 0.8mA, o número de pulsos aumenta e conseqüentemente o número exato de pulsos recebidos pelo animal diminui, dificultando a análise experimental. Desse modo, para evitar inconstâncias no recebimento dos estímulos devido aos pulsos, decidimos utilizar intensidades de 0.2, 0.35 e 0.5mA para medir o efeito de diferentes frequências de correntes na performance dos animais (todos os dados da intensidade de corrente passando pela pata do animal foram registrados em um cartão SD e analisados posteriormente).

## **Tarefa de esquivas inibitória passiva**

### **Primeiro protocolo**

Para esse protocolo utilizamos um estímulo de 0.35mA a 62Hz. Cada animal foi gentilmente colocado na plataforma com a face virada para a quina esquerda do aparelho esquivas inibitória (seção de treino). Quando o animal desce da grade com as quatro patas, ele recebe um choque (estímulo) por três segundos. Em seguida, o animal é retirado do aparato. Após 24 horas (seção de teste), cada animal é colocado novamente na plataforma. Nessa seção não é aplicado o choque quando o animal desce da plataforma. Após descer, cada animal é retirado do aparato e recolocado na caixa moradia [43]. Os parâmetros de tempo do treino e teste foram mensurados, utilizando um cronômetro de ativação manual. O tempo de descida com as quatro patas para grade foi medido nas duas seções (teste e treino). O limiar de corte das latências para descida foi de 60 segundos na seção de treino e de 180 segundos na seção de teste.

### **Segundo protocolo**

Durante a seção de treino, cada animal é gentilmente colocado na plataforma com a face virada para a quina esquerda do aparato de esquivas inibitória. Após descer da plataforma com as quatro patas o animal recebe um choque contínuo (a corrente e a frequência depende do grupo específico) até voltar espontaneamente para a plataforma (latência de escape). Em seguida ele é retirado do aparato. O teto máximo da latência de escape é de 60 segundos [20]. Após 24 horas (seção de teste), o procedimento é exatamente o mesmo descrito no primeiro protocolo para seção de teste. Os parâmetros de tempo no teste e treino foram mensurados utilizando um cronômetro de ativação manual. Os

animais foram divididos em 11 grupos de acordo com a intensidade e frequência do estímulo aplicado (0.2mA; 20,62 e 125Hz), (0.35mA; 10,20,40,62 e 125Hz) e (0.5mA; 20,62 e 125Hz).

### **Desempenho na esQUIVA inibitória passiva (Score)**

Para avaliar o desempenho no IAT, a latência de descida da plataforma nas seções de treino e teste é comparada. De acordo com estudos prévios, a memória é mensurada pela diferença entre a latência de descida da plataforma na seção de treino e a latência de descida na seção de teste [30-32, 43,44] [22-26]. No segundo protocolo, o tempo para escapar do choque muda de animal para animal, deste modo optamos por qualificar o desempenho do animal pela influencia do tempo de exploração da plataforma (latência de descida da plataforma no treino), a duração do choque (latência para escape) e a latência de descida da plataforma no dia do teste, para avaliar esse desempenho utilizamos a equação abaixo.

$$f(t) = \frac{\log(k_1 / SDT)}{(k_2 \cdot SU)} \cdot SD24H \quad (1)$$

f(t): função IAT

SDT: latência de descida da plataforma na seção de treino

SD24: latência de descida da plataforma na seção de teste

SU: latência para escapar do choque

K1: 60s (tempo máximo na plataforma durante a seção de treino)

K2: 3s (tempo mínimo na plataforma durante a seção de teste)

A medida de “aprendizado” é a mesma de todos os artigos clássicos que utilizam a esQUIVA inibitória passiva, sendo a diferença entre a latência de descida da plataforma no treino e a latência de descida no teste após 24 horas. O valor da latência de retorno da plataforma (latência de escape) é utilizado para qualificar e comparar animais com diferentes tempos de fuga em função do aprendizado na tarefa.

O uso da equação  $f(t)$  nos permite preparar o efeito de tratamentos que afetam o retorno à plataforma (ex.: sensibilidade ao choque), sem necessariamente afetar o aprendizado. Se o tempo de retorno a plataforma é diferente entre os animais, a equação balanceia as variáveis resultando em um valor de desempenho.

Adicionalmente qualquer valor da equação acima de 1 indica que a latência para descida da plataforma no dia do teste ( $SD_{24H}$ ) é significativamente maior que a latência para descida no dia do treino ( $SDT$ ), independente do tempo de escape.

## **Drogas**

Guanosina (GUO) foi adquirida da Sigma (St. Louis, MO, USA) sendo diluída em NaCl 0.9%. A solução foi preparada imediatamente antes do uso e propriamente protegida da luz [30,45]. Trinta minutos antes da seção de treino os animais receberam uma dose única intraperitorial (i.p.) injeção de 7.5mg/kg GUO (1ml/kg) ou veículo (NaCl – 0.9%). A dose de Guanosina aplicada foi baseada em estudos prévios do nosso grupo usando protocolos *in vivo* para investigar a anticonvulsivantes [46-49] e efeitos amnésicos na IAT [30].

## **Análises estáticas**

Os dados foram expressos em mediana e intervalo interquartil, uma vez que as variáveis analisadas (latência de descida da plataforma no dia da seção de teste e treino) não seguem uma distribuição normal, utilizando o teste de normalidade D'Agostino&Pearson. A observação teve um limite de 180 segundos. Os dados foram analisados usando o programa Graphpad Prism 5. Para comparar os resultados foi utilizado ANOVA de uma via seguido por Dunnett's, Mann-Whitney ou usando Chi-square com nível de significância de  $p < 0.05$ .

Foi utilizado no total  $n=278$  divididos em: medidas de intensidade de corrente – 48 animais (Figura 3); medidas para pulsos de correntes consecutivas – 20 animais (Figura 4); protocolo um e protocolo dois – 20 animais (Figura 5); influencia da intensidade de corrente e frequência – 90 animais (Figura 6); mapeamento dos efeitos em 0.35mA – 20 animais (Figura 7); experimento com Guanosina – 80 animais (Figura 8).

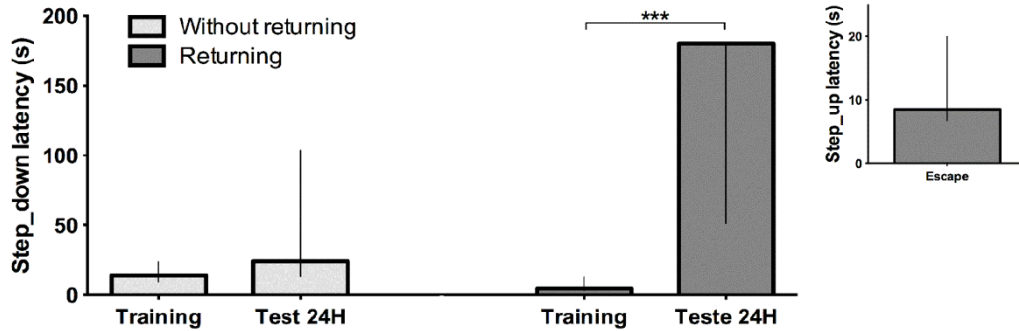
## **Resultados**

Usando nosso novo aparato para esquiva inibitória, a corrente recebida pelas patas do animal tem exatamente a mesma intensidade da corrente aplicada, isento da influencia da bioimpedância do corpo do animal (0.2, 0.4, 0.6 ou 0.8mA) (Figura 3). No entanto, para obter esse resultado é necessário ligar um par de barras de cada vez. Isso é controlado pelo microcontrolador PIC18F4520 que muda os pares de barras de acordo com a frequência selecionadas (20Hz, 62Hz ou 125Hz) e o número de pares (20 pares nesse aparato).

No segundo protocolo (com tempo de escape variável), a media de tempo que os animais recebem o choque foi de 8.5 segundos (intervalo interquartil



7.25-18.5 segundos) e os animais ficaram mais tempo na plataforma durante a seção de teste quando comparado a seção de treino (Figura 5).



**Figura 5** Tempo de descida da plataforma (s) nas seções de treino e teste. Cinza claro representa o grupo que não retorna a plataforma (primeiro protocolo com três segundos de estímulo), cinza escuro representa o grupo que retorna a plataforma (segundo protocolo com tempo de escape) na seção de treino (0.35mA, 62Hz). A latência para escapar do choque no segundo grupo está representada na figura inserida. Os dados estão expressos em mediana e com intervalo interquartil; analisado pelo teste de Mann-Whitney; (n=10 por grupo) \*\*\*p<0.001 comparando com o tempo de descida da plataforma no treino.

O aprendizado foi observado no segundo protocolo, mas não no primeiro (aplicando o estímulo de três segundos), usando 0.35mA 62Hz. Porém, utilizando uma corrente 0.8mA 62Hz por três segundos o comportamento do animal reflete os experimentos clássicos (dados não mostrados). Devido a isso, escolhemos usar o segundo protocolo nos demais experimentos desse estudo.

Não há diferença estatística entre as latências de descida da plataforma no dia do treino entre os grupos (Figura 6A). Existe uma alteração(?) estatística entre os grupos 0.5mA 62Hz e 0.5mA 20-125Hz na latência de escape da grade (Figura 6B). Ademais, para estímulos de 0.2mA a 20, 62 e 125Hz, e 0.35 ou 0.5mA a 20Hz não foi encontrado diferença estatística entre a latência de descida da plataforma na seção de teste e na seção de treino (Figura 6C). Os

animais que receberam o estímulo de 0.35 e 0.5mA a 62 e 125Hz aumentaram consideravelmente o tempo na plataforma na seção de teste (Figura 6C). Aplicando a eq.2 podemos observar a influencia de todas as variáveis que podem contribuir para o processo de aprendizado. Por essa análise matemática, todos os grupos com media acima de 1 são classificados como grupos que apresentaram memoria aversiva (Figura 6D).

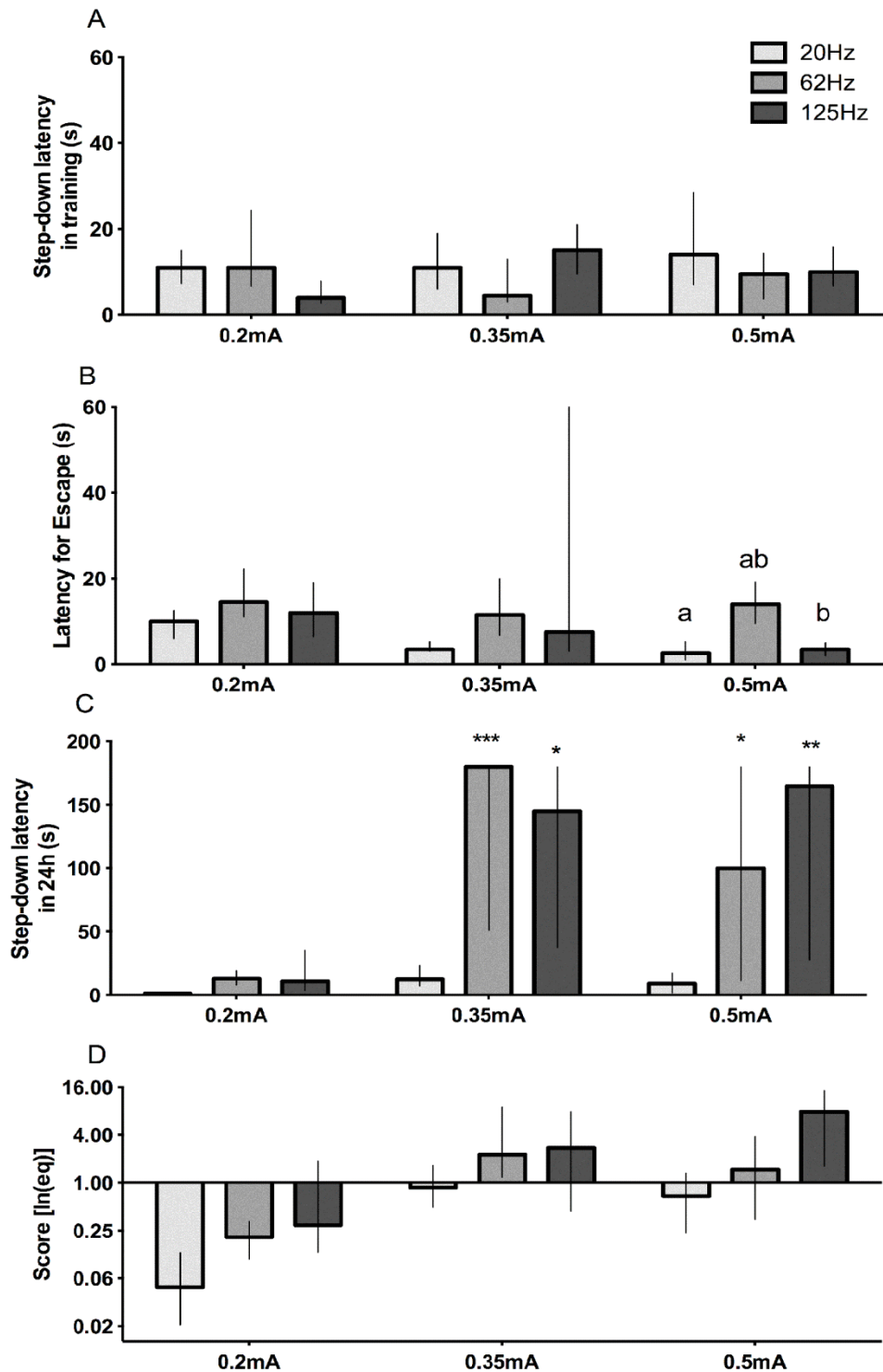


Figura 6 Efeitos da frequência (Hz) e da intensidade de corrente (mA) na latência de descida da plataforma da esquiua inibitória. Efeitos da frequência (Hz) e da intensidade de corrente (mA) na latência na seção de treino – A, latência de escape – B, latência de descida da plataforma na seção de teste – C e score (pontuação) de desempenho (D – a combinação dos três gráficos acima pela aplicação da eq.2). Em

B, a mesma letra representa diferença estatística entre os grupos; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ , por Mann-Whitney, comparado ao mesmo grupo em A. Data representada por mediana intervalo interquartil (n=10/grupo).

A figura 7 demonstra o efeito do estímulo de 0.35mA com diferentes frequências no tempo de descida da plataforma na seção de teste. Para 40Hz o tempo de descida da plataforma na seção de teste é o mesmo observado quando utilizado 0.3-0.5mA em artigos clássicos (mediana de 40-50 segundos). Entretanto, quando utilizamos 62Hz o tempo de descida da plataforma é comparável ao de 0.8mA (media de 180 segundos) e a resposta comportamental ao estímulo se intensifica em altas frequências (Tabela 1).

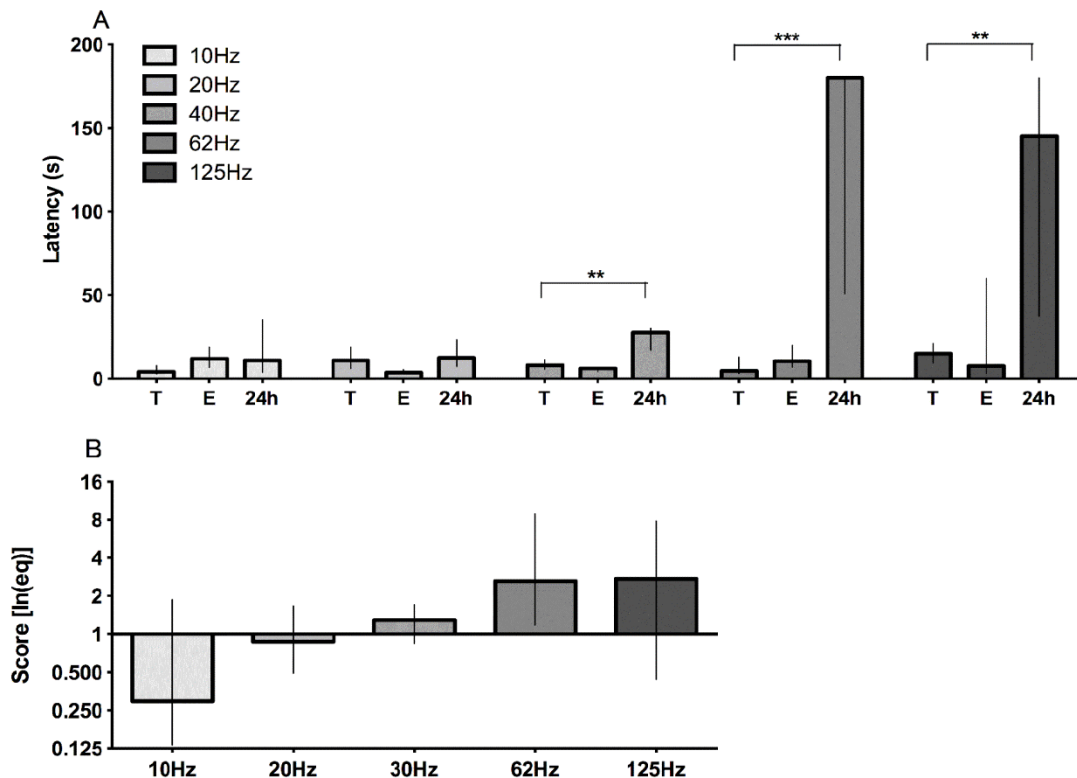


Figura 7 Efeitos da frequência (Hz) aplicando intensidade de corrente 0.35mA na latência de descida da plataforma na esquiiva inibitória. A – efeitos da frequência (Hz) na latência de descida da plataforma na seção de treino (T), latência de escape (E), latência de descida da plataforma na seção de teste (24h) e pontuação de desempenho (B – a combinação dos três parâmetros aplicando a eq.2). \*\* $p < 0.001$ ; \*\*\* $p < 0.001$ , por Mann-Whitney, comparando com o mesmo grupo em A. Data representada por mediana intervalo interquartil (n=10/grupo)

**Tabela 1**

<b>0.35mA 20Hz</b>								
<b>Training</b>				<b>Test</b>				
<b>ID</b>	<b>Vocalization</b>	<b>Flinch</b>	<b>Jump</b>	<b>Rearing</b>	<b>Turn Angle</b>	<b>Freez</b>	<b>Risk ACESSMENT</b>	<b>Faeces</b>
<b>cx1 r1</b>	-	+	-	2	0	0	0	0
<b>cx1 r2</b>	+	+	-	6	6	1	2	Ok
<b>cx1 r3</b>	-	+	-	3	2	0	2	Ok
<b>cx2 r3</b>	-	++	-	5	3	0	2	0
<b>cx2 r4</b>	+	+	-	2	1	0	1	Ok
<b>cx3 r4</b>	+	++	-	1	0	0	0	Ok

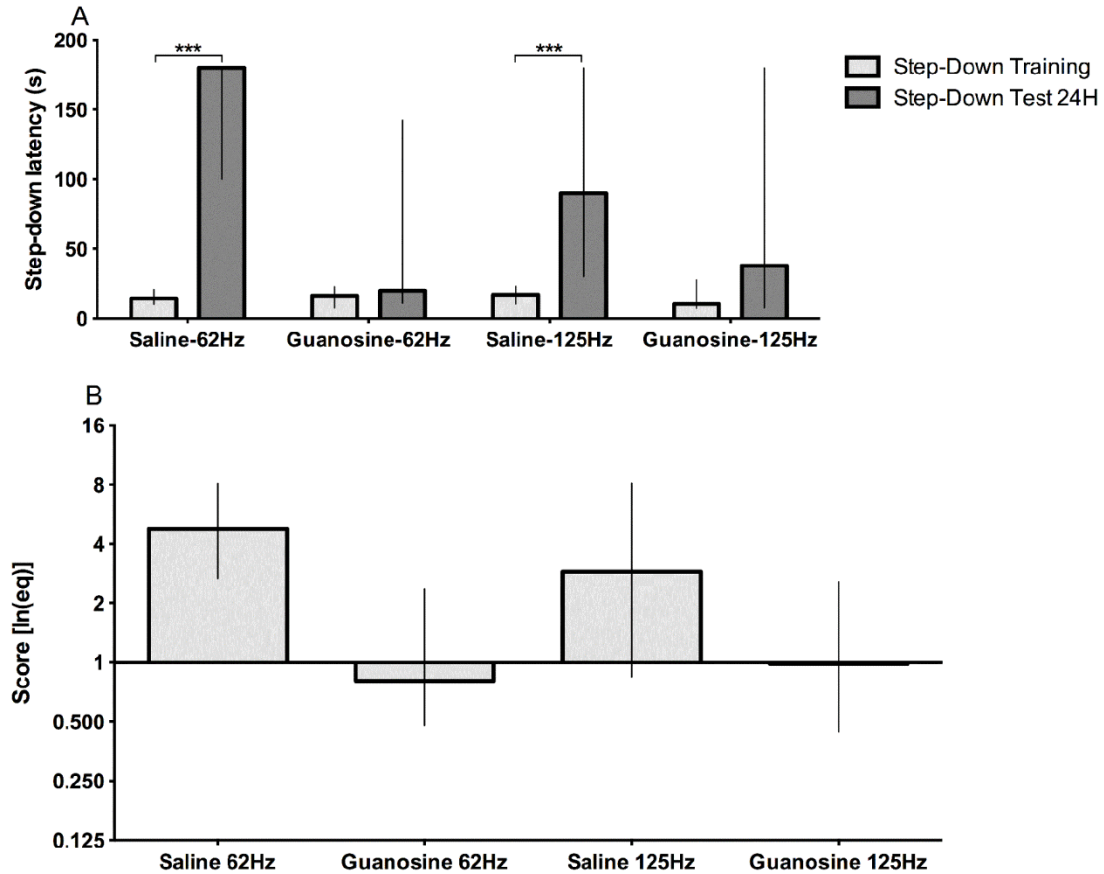
  

<b>0.35mA 62Hz</b>								
<b>Training</b>				<b>Test</b>				
<b>ID</b>	<b>Vocalization</b>	<b>Flinch</b>	<b>Jump</b>	<b>Rearing</b>	<b>Turn Angle</b>	<b>Freez</b>	<b>Risk ACESSMENT</b>	<b>Faeces</b>
<b>cx1 r4</b>	++	++	-	10	4	0	7	Ok
<b>cx1 r5</b>	+++	+++	+	5	5	0	5	Ok
<b>cx2 r1</b>	++	++	+	7	3	0	6	Ok
<b>cx2 r2</b>	++	++	+	3	2	0	5	0
<b>cx3 r1</b>	+++	+++	-	5	3	0	6	Ok
<b>cx3 r2</b>	+	+++	+	14	8	0	7	Ok
<b>cx3 r3</b>	+++	+++	+	2	1	0	3	Ok

**Tabela 1** Descrição da observação comportamental de resposta no teste e treino na esQUIVA INIBITÓRIA. + um episódio, ++ entre dois e quatro episódios, +++ mais de quatro episódios; no teste número absoluto de eventos durante a seção de teste

Usando o segundo protocolo observamos uma diminuição na memória na esQUIVA INIBITÓRIA pela administração da Guanosina i.p. 7.5mg/kg a uma estimulação 0.35mA, a 62 e 125Hz (Figura 8). Mesmo com o grupo Guanosina

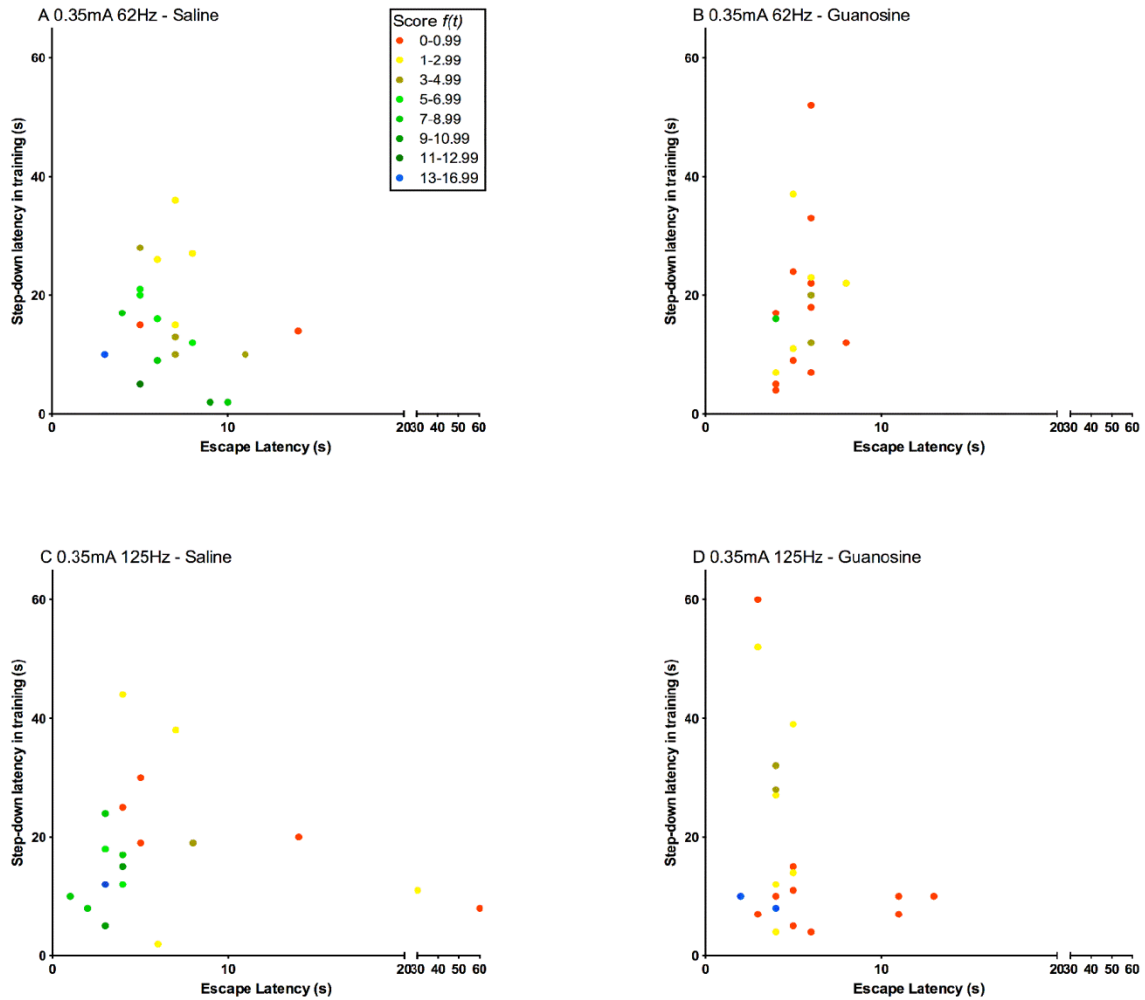
apresentando maior tempo de retorno a plataforma, foi observado o efeito amnésico desse composto.



**Figura 8** Efeito da Guanosina na latência de descida da plataforma na tarefa de esquila inibitória. (A) Efeito da Guanosina (i.p. – 7.5mg/kg) no tempo de descida da plataforma na tarefa de esquila inibitória utilizando 0.35mA com diferentes frequências (62Hz e 125Hz). Todos os grupos apresentaram uma latência de escape similar (dados não mostrados). Barras expressas em mediana (intervalo interquartil). (B) Aplicação da eq.2 nos dados do gráfico A. Dados analisados pelo teste de Mann-Whitney (n=20 por grupo); \*\*\*p<0.001.

Existe a influencia da latência de retorno a plataforma na seção de treino (latência de escape) e da latência de descida da plataforma na seção de treino na pontuação de desempenho de ambos os grupos administrados salina (Figura 9 A-C) e Guanosina (Figura 9 B-D). Observamos que 18% dos animais tratados com Guanosina e 17.5% dos animais controle obtiveram pontuação  $\geq 1$  e  $< 2.99$ .

Entretanto, o número de animais tratados com Guanosina com a pontuação maior que três é significativamente menor que o grupo controle (17%,65%, respectivamente) ( $p < 0.0001$ , Chi-square) (Veja a figura 9).



**Figura 9** Influência no aprendizado do tempo de exploração da plataforma na seção de treino (step-down latency in training) e tempo de estímulo (escape latency). A escala de cores indica a pontuação do animal de acordo com a eq.2. (A) Grupo Salina exposto a 0.35mA, 62Hz. (B) Grupo Guanosina exposto a 0.35mA, 62Hz. (C) Grupo Salina exposto a 0.35mA, 125Hz. (D) Grupo Guanosina exposto a 0.35mA, 125Hz. (n=20/grupo).

## Discussão

Em nosso aparato, a intensidade do estímulo elétrico não depende da bioimpedância do animal (Figura 3). Isso permite avaliar o efeito real do estímulo entre grupos de animais com diferentes valores de bioimpedância, eliminando a influência das condições de moradia [50] do fenótipo, genótipo [34,35], tratamentos como exercícios físicos [51] e drogas [52], assim como mudanças no valor da bioimpedância [53].

Além do mais, nosso objetivo foi desenhar um aparato cuja frequência e intensidade do estímulo sejam fácil e claramente controladas com registro durante todo o experimento, uma vez que os estudos que utilizam aparatos desenhados para avaliar a tarefa de esquiva inibitória não consideram a influência da bioimpedância do animal na corrente aplicada, nem da frequência e da intensidade de estímulo. Esses três pontos claramente influenciam no comportamento do animal, conforme nossos resultados.

Uma das grandes vantagens das nossas modificações é garantir que a corrente aplicada durante a tarefa é a mesma para todos os animais. Em palavras simples, se um pesquisador seleciona 0.5mA nos aparelhos tradicionais ele pode aplicar 0.25-0.4mA, resultando em uma alta variação na performance final dos animais. Com esse novo aparato, somos capazes de reduzir essa diminuição de 21-58% (aparelho tradicional) para 0.1-3% (Figura 3). Usando o aparelho tradicional para tarefa de esquiva inibitória passiva, cada animal pode receber uma diferente intensidade de estímulo (devido as diferenças na composição corporal); desse modo, comparações entre animais com diferentes idades, sexo ou peso é prejudicada, devido as diferenças na bioimpedância dos animais.

É importante observar que, além da bioimpedância, a condição elétrica também depende de fatores extracorpóreos que podem ficar entre as patas e as



barras durante o teste (fezes, etc.), outro fator difícil de quantificar. Essa é uma razão adicional para registrar a corrente que passa pelo animal, se qualquer fator diminuir a intensidade da corrente esse será visualizado.

A frequência modifica o efeito da intensidade da corrente no comportamento do animal durante a tarefa de aprendizado da esquivinha inibitória (Tabela 1). Esse é um parâmetro não padronizado e usualmente não citado nos artigos, mas é tão importante quanto à intensidade da corrente como confirmado por nossos dados (Figuras 6 e 7).

A escolha da frequência foi baseada nas frequências utilizadas nos aparelhos de eletroestimulação utilizadas na fisioterapia, usualmente 10-100Hz [33]. A frequência de 10Hz foi utilizada por Barin[20], e o valor da frequência utilizada na maioria dos artigos não é especificada. Mesmo utilizando baterias como fontes, o estímulo deve ser dado na forma de pulsos, a corrente constante (corrente Gaussiana) promove a contração constante dos músculos e pode queimar a pele (efeito Joule). Além disso, precisávamos definir a janela de frequência ideal para esse trabalho. Nesse sentido, trabalhamos com frequências baixas como 20Hz para responder qual a menor frequência que pode ser utilizada afim de obter aprendizado na tarefa.

Nisto, existe uma relação no desempenho entre o tempo de permanência na plataforma na seção de teste e a frequência da corrente (Figura 6 e 7). O comportamento de escapar do choque é a mesma para frequências de 20Hz e 125Hz, mas não o desempenho na seção de teste. Essa modificação no aparato de esquivinha inibitória permitiu controlar variáveis até então não especificadas [18,32,39,54]. Nossos dados demonstram que não apenas a intensidade da corrente, mas também a frequência exerce um papel fundamental no desempenho e aprendizado na tarefa de esquivinha inibitória. Esse dado sobre a frequência é uma das informações que faltam na maior parte dos estudos usando

IAT [19,41,55,56]. Observamos aprendizado utilizando 0.35 e 0.5mA a 62 e 125Hz, mas não a 20Hz (Figura 6). A latência de escape para a plataforma durante o estímulo é similar para todas as intensidades de corrente, até a mais baixa aplicada (0.2mA), independente da frequência administrada.

É importante enfatizar a programação de uma frequência modulante dentro das frequências utilizadas (Figura 2), isso permite evitar a contração muscular contínua provocada pela passagem da corrente pelo corpo do animal. Além disso, a mudança do formato da barra evita que o animal agarre a mesma durante o estímulo (Figura 1). Porém, apenas isso não é suficiente para resolver o problema da influência da bioimpedância na corrente elétrica. Nessas condições, mudamos a forma e distribuição das barras, assim como a forma de acionamento. Em razão disso, não podemos aplicar o padrão de choque utilizado na maioria dos modelos clássicos dos aparatos desenhados para esQUIVA INIBITÓRIA PASSIVA porque precisamos ligar um par de barras por vez. Ademais, a comparação entre o nosso aparelho e os tradicionais (um sem influência da bioimpedância e outro com, respectivamente) é dificultado por não podermos controlar a frequência dos aparelhos tradicionais, e nem medir a intensidade real passando pelos animais.

Com o novo aparato apresentado aqui, somos capazes de: (1) abolir a influência da bioimpedância na intensidade da corrente recebida pelo animal; (2) controlar precisamente a corrente recebida durante a entrega do choque no decorrer da tarefa; (3) controlar e registrar constantemente a intensidade e frequência da corrente efetiva aplicada, habilitando o registro completo de todo o experimento. Nisto temos uma clara redução da diminuição da corrente efetiva para apenas 0.1-3%, indicando uma influência insignificante da bioimpedância (Figura 3).

A Guanosina, uma purina de base guanina, desenvolve um papel importante no sistema nervoso central [49,57], com um bem estabelecido efeito amnésico em roedores [30,31,49]. Por consequência, validamos nosso novo aparato usando animais tratados com injeções de Guanosina i.p.. Observando um significativo efeito da Guanosina na memória de esquiva inibitória mesmo com uma variação no tempo de escape.

Levando tudo em consideração, esse novo aparato oferece um substancial avanço na análise comportamental em tarefas que envolvem esquiva inibitória passiva, por considerar parâmetros cruciais até então não considerados, como a frequência do estímulo aplicado e, principalmente, a influencia da bioimpedância do animal. Essa influencia foi drasticamente reduzida pela mudança da forma e distribuição das barras no aparato, que permite registrar a corrente exata que passa precisamente pela pata do animal durante a tarefa e comparar resultados entre animais com diferentes composições corporais. A respeito desses achados, apenas estudos futuros com clássicas doenças com prejuízo de memória ou potenciais drogas moduladoras de memória podem afirmar o potencial pleno desse novo aparato. Finalmente, nos também propomos uma equação matemática que pode melhorar a análise da performance do animal na tarefa de esquiva inibitória.

## **Referências**

1. Thorndike EL (1898) Animal intelligence : an experimental study of the associative processes in animals. New York ; London: The Macmillan Company. 109 p. p.
2. Skinner BF (1938) The behavior of organisms. New York,: Appleton-Century-Crofts. xv, 457 p. p.

3. Hudson BB (1950) One-trial learning in the domestic rat. *Genet Psychol Monogr* 41: 99-145.
4. Jarvik ME, Kopp R (1967) An improved one-trial passive avoidance learning situation. *Psychol Rep* 21: 221-224.
5. Perry ML, Dias RD, Carrasco MA, Izquierdo I (1983) Step-down inhibitory avoidance training and beta-endorphin-like immunoreactivity of rat hypothalamus and plasma. *Braz J Med Biol Res* 16: 339-343.
6. Ardenghi P, Barros D, Izquierdo LA, Bevilaqua L, Schroder N, et al. (1997) Late and prolonged post-training memory modulation in entorhinal and parietal cortex by drugs acting on the cAMP/protein kinase A signalling pathway. *Behav Pharmacol* 8: 745-751.
7. Bernabeu R, Bevilaqua L, Ardenghi P, Bromberg E, Schmitz P, et al. (1997) Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 7041-7046.
8. Bianchin M, Walz R, Ruschel AC, Zanatta MS, Da Silva RC, et al. (1993) Memory expression is blocked by the infusion of CNQX into the hippocampus and/or the amygdala up to 20 days after training. *Behav Neural Biol* 59: 83-86.
9. Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361: 31-39.
10. Izquierdo I, Barros DM, Mello e Souza T, de Souza MM, Izquierdo LA, et al. (1998) Mechanisms for memory types differ. *Nature* 393: 635-636.
11. Izquierdo I, Bianchin M, Silva MB, Zanatta MS, Walz R, et al. (1993) CNQX infused into rat hippocampus or amygdala disrupts the expression of memory of two different tasks. *Behav Neural Biol* 59: 1-4.

12. Izquierdo I, Medina JH, Vianna MR, Izquierdo LA, Barros DM (1999) Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behav Brain Res* 103: 1-11.
13. Izquierdo I, Quillfeldt JA, Zannata MS, Quevedo J, Schaeffer E, et al. (1997) Sequential role of hippocampus and amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in formation and retrieval of memory for inhibitory avoidance in rats. *Eur J Neurosci* 9: 786-793.
14. Jerusalinsky D, Ferreira MB, Walz R, Da Silva RC, Bianchin M, et al. (1992) Amnesia by post-training infusion of glutamate receptor antagonists into the amygdala, hippocampus, and entorhinal cortex. *Behav Neural Biol* 58: 76-80.
15. Walz R, Roesler R, Quevedo J, Sant'Anna MK, Madruga M, et al. (2000) Time-dependent impairment of inhibitory avoidance retention in rats by posttraining infusion of a mitogen-activated protein kinase inhibitor into cortical and limbic structures. *Neurobiol Learn Mem* 73: 11-20.
16. Cammarota M, Bernabeu R, Levi De Stein M, Izquierdo I, Medina JH (1998) Learning-specific, time-dependent increases in hippocampal Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II activity and AMPA GluR1 subunit immunoreactivity. *Eur J Neurosci* 10: 2669-2676.
17. Alonso M, Viola H, Izquierdo I, Medina JH (2002) Aversive experiences are associated with a rapid and transient activation of ERKs in the rat hippocampus. *Neurobiol Learn Mem* 77: 119-124.
18. Vinade ER, Izquierdo I, Lara DR, Schmidt AP, Souza DO (2004) Oral administration of guanosine impairs inhibitory avoidance performance in rats and mice. *Neurobiol Learn Mem* 81: 137-143.
19. Galindo LE, Garin-Aguilar ME, Medina AC, Serafin N, Quirarte GL, et al. (2008) Acquisition and retention of enhanced active avoidance are unaffected by

interference with serotonergic activity. *Behavioural Brain Research* 195: 153-158.

20. Garin-Aguilar ME, Medina AC, Quirarte GL, McGaugh JL, Prado-Alcala RA (2014) Intense aversive training protects memory from the amnestic effects of hippocampal inactivation. *Hippocampus* 24: 102-112.

21. Quevedo J, Vianna MR, Roesler R, de-Paris F, Izquierdo I, et al. (1999) Two time windows of anisomycin-induced amnesia for inhibitory avoidance training in rats: protection from amnesia by pretraining but not pre-exposure to the task apparatus. *Learn Mem* 6: 600-607.

22. Cammarota M, Bevilaqua LR, Medina JH, Izquierdo I (2004) Retrieval does not induce reconsolidation of inhibitory avoidance memory. *Learn Mem* 11: 572-578.

23. Vianna MR, Szapiro G, McGaugh JL, Medina JH, Izquierdo I (2001) Retrieval of memory for fear-motivated training initiates extinction requiring protein synthesis in the rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 12251-12254.

24. Cammarota M, Bevilaqua LR, Kerr D, Medina JH, Izquierdo I (2003) Inhibition of mRNA and protein synthesis in the CA1 region of the dorsal hippocampus blocks reinstatement of an extinguished conditioned fear response. *J Neurosci* 23: 737-741.

25. Bevilaqua LR, da Silva WN, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M (2005) Extinction and reacquisition of a fear-motivated memory require activity of the Src family of tyrosine kinases in the CA1 region of the hippocampus. *Pharmacol Biochem Behav* 81: 139-145.

26. Vinade ER, Schmidt AP, Frizzo ME, Portela LV, Soares FA, et al. (2005) Effects of chronic administered guanosine on behavioral parameters and brain glutamate uptake in rats. *J Neurosci Res* 79: 248-253.

27. Bonini JS, Da Silva WC, Da Silveira CK, Kohler CA, Izquierdo I, et al. (2011) Histamine facilitates consolidation of fear extinction. *Int J Neuropsychopharmacol* 14: 1209-1217.
28. Schmidt do Prado-Lima PA, Perrenoud MF, Kristensen CH, Cammarota M, Izquierdo I (2011) Topiramate diminishes fear memory consolidation and extinguishes conditioned fear in rats. *J Psychiatry Neurosci* 36: 250-255.
29. Brunner D, Nestler E, Leahy E (2002) In need of high-throughput behavioral systems. *Drug Discov Today* 7: S107-112.
30. Roesler R, Vianna MR, Lara DR, Izquierdo I, Schmidt AP, et al. (2000) Guanosine impairs inhibitory avoidance performance in rats. *Neuroreport* 11: 2537-2540.
31. Saute JA, da Silveira LE, Soares FA, Martini LH, Souza DO, et al. (2006) Amnesic effect of GMP depends on its conversion to guanosine. *Neurobiol Learn Mem* 85: 206-212.
32. Petronilho F, Perico SR, Vuolo F, Mina F, Constantino L, et al. (2012) Protective effects of guanosine against sepsis-induced damage in rat brain and cognitive impairment. *Brain Behav Immun* 26: 904-910.
33. Lloyd T, G DED, Strauss GR, Singer K (1986) A review of the use of electro-motor stimulation in human muscles. *Aust J Physiother* 32: 18-30.
34. Wahlsten D (1972) Phenotypic and genetic relations between initial response to electric shock and rate of avoidance learning in mice. *Behav Genet* 2: 211-240.
35. Carran AB, Yeudall LT, Royce JR (1964) Voltage Level and Skin Resistance in Avoidance Conditioning of Inbred Strains of Mice. *J Comp Physiol Psychol* 58: 427-430.

36. Kyle UG, Bosaeus I, De Lorenzo AD, Deurenberg P, Elia M, et al. (2004) Bioelectrical impedance analysis--part I: review of principles and methods. *Clin Nutr* 23: 1226-1243.
37. Webster JG, Clark JW (2010) *Medical instrumentation : application and design*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons. xix, 713 p. p.
38. Smith D, Jr., Johnson M, Nagy T (2009) Precision and accuracy of bioimpedance spectroscopy for determination of in vivo body composition in rats. *Int J Body Compos Res* 7: 21-26.
39. Farmer GE, Thompson LT (2012) Learning-dependent plasticity of hippocampal CA1 pyramidal neuron postburst afterhyperpolarizations and increased excitability after inhibitory avoidance learning depend upon basolateral amygdala inputs. *Hippocampus* 22: 1703-1719.
40. Nazari-Serenjeh F, Rezayof A (2013) Cooperative interaction between the basolateral amygdala and ventral tegmental area modulates the consolidation of inhibitory avoidance memory. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 40: 54-61.
41. Bach SA, de Siqueira LV, Muller AP, Oses JP, Quatrim A, et al. (2014) Dietary omega-3 deficiency reduces BDNF content and activation NMDA receptor and Fyn in dorsal hippocampus: Implications on persistence of long-term memory in rats. *Nutr Neurosci* 17: 186-192.
42. Botton PH, Costa MS, Ardais AP, Mioranza S, Souza DO, et al. (2010) Caffeine prevents disruption of memory consolidation in the inhibitory avoidance and novel object recognition tasks by scopolamine in adult mice. *Behav Brain Res* 214: 254-259.
43. Cline BH, Steinbusch HW, Malin D, Revishchin AV, Pavlova GV, et al. (2012) The neuronal insulin sensitizer dicholine succinate reduces stress-



induced depressive traits and memory deficit: possible role of insulin-like growth factor 2. *BMC Neurosci* 13: 110.

44. Detrait ER, Hanon E, Dardenne B, Lamberty Y (2009) The inhibitory avoidance test optimized for discovery of cognitive enhancers. *Behav Res Methods* 41: 805-811.

45. Jiang S, Bendjelloul F, Ballerini P, D'Alimonte I, Nargi E, et al. (2007) Guanosine reduces apoptosis and inflammation associated with restoration of function in rats with acute spinal cord injury. *Purinergic Signal* 3: 411-421.

46. Lara DR, Schmidt AP, Frizzo ME, Burgos JS, Ramirez G, et al. (2001) Effect of orally administered guanosine on seizures and death induced by glutamatergic agents. *Brain Res* 912: 176-180.

47. Schmidt AP, Lara DR, de Faria Maraschin J, da Silveira Perla A, Onofre Souza D (2000) Guanosine and GMP prevent seizures induced by quinolinic acid in mice. *Brain Res* 864: 40-43.

48. Schmidt AP, Avila TT, Souza DO (2005) Intracerebroventricular guanine-based purines protect against seizures induced by quinolinic acid in mice. *Neurochem Res* 30: 69-73.

49. Schmidt AP, Lara DR, Souza DO (2007) Proposal of a guanine-based purinergic system in the mammalian central nervous system. *Pharmacol Ther* 116: 401-416.

50. Skalicky M, Narath E, Viidik A (2001) Housing conditions influence the survival and body composition of ageing rats. *Exp Gerontol* 36: 159-170.

51. Muller AP, Gnoatto J, Moreira JD, Zimmer ER, Haas CB, et al. (2011) Exercise increases insulin signaling in the hippocampus: physiological effects and pharmacological impact of intracerebroventricular insulin administration in mice. *Hippocampus* 21: 1082-1092.

52. Glick SD, Greenstein S, Goldfarb J (1973) Increased electrical impedance of mice following administration of scopolamine. *Behav Biol* 9: 771-775.
53. Hu L, Maslanik T, Zerebeckyj M, Plato CF (2012) Evaluation of bioimpedance spectroscopy for the measurement of body fluid compartment volumes in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods* 65: 75-82.
54. Izquierdo LA, Barros DM, Ardenghi PG, Pereira P, Rodrigues C, et al. (2000) Different hippocampal molecular requirements for short- and long-term retrieval of one-trial avoidance learning. *Behav Brain Res* 111: 93-98.
55. Matte C, Pereira LO, Dos Santos TM, Mackedanz V, Cunha AA, et al. (2009) Acute homocysteine administration impairs memory consolidation on inhibitory avoidance task and decreases hippocampal brain-derived neurotrophic factor immunocontent: prevention by folic acid treatment. *Neuroscience* 163: 1039-1045.
56. Furini CR, Myskiw JC, Schmidt BE, Marcondes LA, Izquierdo I (2014) D1 and D5 dopamine receptors participate on the consolidation of two different memories. *Behavioural Brain Research* 271: 212-217.
57. Tarozzi A, Merlicco A, Morroni F, Bolondi C, Di Iorio P, et al. (2010) Guanosine protects human neuroblastoma cells from oxidative stress and toxicity induced by Amyloid-beta peptide oligomers. *J Biol Regul Homeost Agents* 24: 297-306.

## 5. METODOLOGIA

O desenvolvimento dos equipamentos teve como plataforma os microcontroladores da linha PIC18F4520, escolhida pela flexibilidade, robustez e acessibilidade. A linguagem de programação adotada será o C++ utilizada no programa mickroC PRO for PIC que é o responsável pela compilação do mesmo (transdução das linhas de comando em código hexadecimal). A gravação do programa no microcontrolador deverá ser feita pelo programa PICkit 2 v2.61 utilizando o kit ACE USB como interface física entre o computador e o microcontrolador.

A utilização dos equipamentos desenvolvidos no decorrer desse projeto se dará por alunos de escolas públicas do município de Porto Alegre/RS que obtiveram escores igual ou inferior a 3,1 na avaliação do IDEB em 2009.

O trabalho deve ser realizado no período de uma semana, três dias em um colégio da rede pública de Porto Alegre (a ser escolhido) com alunos em processo de alfabetização e dois dias nas instalações da UFRGS, sala de neuroengenharia. Antes da realização da semana de experimento será enviado um termo de consentimento para os pais ou responsáveis e a direção do colégio, o projeto será exposto ao comitê de ética.

A coleta de dados constituirá por meio de vídeos, entrevistas e a análise dos dados será feita de forma qualitativamente (método de fichamento ou análise de rede social).

### 5.1. CARACTERIZAÇÃO DA PESQUISA

Quanto à Natureza: teórica e empírica

Quanto ao Tratamento dos Dados: Pesquisa Quantitativa e Experimental.

Quanto aos Fins: Exploratória, Descritiva e Explicativa.

Quanto à conduta em relação aos Dados: Experimental.

## **5.2. SELEÇÃO DA POPULAÇÃO E AMOSTRA**

Alunos que estudam em uma das três escolas públicas do município de Porto Alegre/RS que obtiveram escores igual ou inferior a 3,1 na avaliação do IDEB em 2009.

<b>ESCOLA</b>	<b>2005</b>	<b>2007</b>	<b>2009</b>
Esc. Est. Ens. Fund. Vila Cruzeiro do Sul [Escola Aberta]	x	0,9	1,1
Esc. Est. Ens. Fund. Alvarenga Peixoto	2,2	2,5	2,9
Esc. Est. Ens. Fund. Santa Rita de Cássia	3,2	2,7	3,1

## **5.3. COLETA DE DADOS**

A coleta de dados será por meio de vídeos e entrevistas de acordo com o anexo 2.

## **5.4. ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DOS DADOS**

A análise dos dados será feita de forma qualitativamente (método de fichamento ou análise de rede social), através da utilização de procedimentos estatísticos.

## **6. ENSAIO DE PESQUISA (proposta)**

As atividades começarão após aprovação do comitê de ética da UFRGS e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos responsáveis dos alunos.

**No primeiro dia**, um monitor (doutorando Gilvan Luiz Borba Filho) será responsável por realizar a entrevista individual de conhecimentos prévios (média de 5 minutos por aluno), registrando as respostas em vídeo e na ficha de conhecimentos prévios. Enquanto as entrevistas estiverem sendo realizadas, os demais alunos ficaram desenhando sobre a visão do que é ser um cientista.

**No segundo dia**, os alunos receberão o equipamento de teste de condutividade (um por aluno), onde os alunos terão 10 minutos para testar livremente, na sala de aula, que materiais fazem a luz do equipamento acender e quais não faz, após esse tempo será feita uma entrevista individual expondo diversos materiais: barras de metal, madeira, malha de aço, água destilada, água com sal e isopor. As perguntas seguirão o anexo 2, todas as respostas registradas em vídeo.

**No terceiro dia**, os alunos seguirão em um ônibus da UFRGS para o departamento de bioquímica, os alunos serão apresentados ao equipamento de esquiava inibitória para zebrafish, a explicação de seu funcionamento será em cima dos experimentos previamente feitos.

O experimento será realizado na sala de neuroengenharia, sala anexa ao departamento de bioquímica realizado na sala de neuroengenharia, sala anexa ao departamento de bioquímica. Os alunos entrarão em turmas de 10 alunos, enquanto esperam para entrar os alunos serão apresentados a alguns alunos da bioquímica (voluntários) que falarão um pouco sobre a universidade e seus experimentos.

O equipamento será calibrado para 0.01mA , de modo a fornecer um leve estímulo para o animal evitar uma zona (amarela ou verde) escolhida pelos alunos, nesse momento será introduzido o conceito de memória de trabalho e aprendizado, o zebrafish será retirado do primeiro aquário moradia e gentilmente colocado no aparato de esquiava inibitória para zebrafish, no lado

oposto ao escolhido como lado aversivo. Ao entrar no compartimento aversivo o zebrafish receberá um breve pulso de 0.01mA para voltar ao compartimento seguro, esse procedimento será repetido até o animal atingir uma latência de 60segundos no compartimento seguro. Após esse tempo o animal será recolocado no segundo aquário moradia. Esse procedimento será repetido de forma a possibilitar que os alunos vejam a diferença na memória de trabalho dos diferentes zebrafishes.

**No quarto dia**, os alunos seguirão em um ônibus da UFRGS para o departamento de bioquímica onde irão participar de um experimento de esquiva inibitória envolvendo ratos Wistar de 3-4meses. O experimento será realizado na sala de neuroengenharia, sala anexa ao departamento de bioquímica. Os alunos entrarão em turmas de 10 alunos, enquanto esperam para entrar os alunos serão apresentados a alguns alunos da bioquímica (voluntários) que falarão um pouco sobre a universidade e seus experimentos. Antes de entrar na sala de neuroengenharia serão devidamente vestidos com jalecos descartáveis, os alunos serão apresentados ao equipamento de esquiva inibitória e a explicação de como o teste funciona será devidamente fornecida.

Antes do teste um momento para perguntas será reservado, os alunos serão apresentados a um rato Wistar (que não será utilizado no experimento) para conscientização do que é um animal de laboratório, por que ele é utilizado, como ele é criado, bem como os parâmetros éticos que estão envolvidos na pesquisa animal. Em seguida será pedido silêncio absoluto, o equipamento de esquiva inibitória será calibrado para 0.35mA 62Hz, um rato Wistar será colocado na plataforma e o tempo de descida será registrado, após descer o rato levará o estímulo até retornar para a plataforma, será retirado e posto em sua caixa moradia.

Serão realizadas perguntas de acordo com o anexo 2. Após as respostas, o equipamento de esquivas inibitórias deverá ser devidamente limpo e será pedido mais um momento de silêncio. Logo após, o monitor pegará um animal previamente treinado na esquivas inibitórias e o apresentará, dizendo que o animal foi treinado na esquivas no dia anterior. O animal será calmamente colocado na plataforma e o tempo de descida registrado em cronometro (teto de 60 segundos). Após esse tempo o animal deve ser retirado e colocado em sua casa moradia. A turma sairá dando espaço para uma nova turma que será exposta ao mesmo procedimento.

**Quinto dia**, pediremos para os alunos desenharem sobre o que eles acharam dos experimentos, descrevendo as diferenças (se existirem) na facilidade de aprendizado dos peixes quando comparados aos ratos. Será um dia para conversa informal entre o monitor e as crianças.

## **7. DISCUSSÃO**

Durante o decorrer desse doutorado diversos equipamentos foram desenvolvidos com a finalidade de aproximar a neurociência dos alunos em processo de alfabetização, um deles (anexo 2) foi destinado ao laboratório do professor Luc Pellerin do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Biologia e Medicina da Universidade de Lausanne (Suíça) e utilizado em parcerias com os alunos do Departamento de Bioquímica da UFRGS, Alexandre Muller e Roberto F. Almeida, sendo um equipamento de monitoramento de atividade em rodas de exercício. Outros mais simples, como um medidor de condutividade (anexo 4) foi utilizado por alunos em um projeto de extensão do PPG de educação em ciências da UFSM, orientado pelo professor João Batista com a finalidade de introduzir o conceito de corrente elétrica e condutividade.

Foram realizadas tentativas de leitura de sinais eletrofisiológicos do cérebro de zebrafish in vivo livre no aquário, com amplificadores e filtros de acordo com o anexo 5. No entanto, o processo cirúrgico de implante desses eletrodos ainda necessita ser dominado.

Durante a escolha de qual experimento em neurociências deveria servir de base para o trabalho com os alunos em fase de alfabetização, ficou claro que teria que ser um experimento com resultados claros e concreto, cujo resultado fosse visível a olho nú e lógico o suficiente para que os alunos pudessem compreender. A escolha da tarefa de esQUIVA inibitória passiva acabou sendo a mais óbvia, uma vez que o aprendizado na esQUIVA ocorre em segundos e o comportamento do animal que aprende a tarefa difere claramente do animal que não a aprende.

Ao iniciar os trabalhos com a esQUIVA inibitória com ratos tornou-se claros os problemas operacionais decorrentes da variabilidade da corrente elétrica em função das características fisiológicas dos animais, dentro do mesmo grupo a variação da intensidade de corrente chegava a 50%. Fez-se necessário alguns meses de estudo para chegar a uma solução plausível e mais alguns meses para a construção de um protótipo, de modo a realizar os testes para confirmar a resolução do problema. No total, foram 2 anos dedicados a solucionar um problema conhecido pela comunidade científica a algumas décadas “I largely used this type of tasks and I know problems for using this type of tasks.” “ it is well known that giving the intensity of a footshock not always reflect the strenght of the electrical footshock” (Reviewer #1 – Artigo Anexo 1) , “electric shocks are not precisely controlled in most typical IAT setups” (Reviewer #2 – Artigo Anexo 1).

Além do problema de variabilidade da intensidade da corrente (corrigido em nosso aparelho), existe outra variável até então negligenciada, a frequência



do estímulo aplicado. Apesar de não estar claro como o cérebro processa as informações aversivas da esQUIVA INIBITÓRIA, ficou evidente que ela depende da frequência com que o estímulo é fornecido, sendo possível manipular o aprendizado pelo aumento da frequência e não da intensidade, o que evita danos ao corpo do animal e diminui o desconforto do mesmo na tarefa.

As melhorias realizadas no equipamento de esQUIVA INIBITÓRIA PASSIVA resultaram na diminuição do número de animais utilizados no teste, assim como a possibilidade de comparações entre animais de sexo e peso diferentes.

Atualmente, existe uma grande preocupação na busca de modelos alternativos, apesar dos ratos serem um modelo indispensável para vários ensaios, ele pode ser substituído por modelos animais mais simples em alguns casos de tarefas de aprendizado e memória aversiva, sem a presença de fármacos. No entanto, existem poucos trabalhos que abordam a esQUIVA INIBITÓRIA com zebrafish, todos com intensidades diferentes e formas diferentes de eletrodos. Nos trabalhos publicados até o momento não foram descritas informações sobre intensidade de corrente e tipo de água utilizada no teste, o que torna quase impossível a replicabilidade do experimento e o que nos levou a uma padronização completa da tarefa, rendendo um ano de estudo.

Afim que conseguir um modelo alternativo válido para o rato na tarefa de esQUIVA INIBITÓRIA PASSIVA, realizamos um estudo completo das variáveis existentes na tarefa de IAT com zebrafish. Esse estudo rendeu um manuscrito em preparação e um equipamento aonde o índice de aprendizado chega a 90%.

Devido a complexidade na construção dos equipamentos e das soluções demandadas por eles, não foi possível, nesse trabalho, realizar os experimentos propostos com os alunos em fase de alfabetização. Os equipamentos foram disponibilizados para os alunos de graduação (iniciação científica) e pós-

graduação, que agora dispõe de equipamentos mais confiáveis e precisos para a realização dos experimentos científicos.

## **8. PERSPECTIVAS**

A finalização das atividades pendentes, como a submissão do manuscrito 1, a realização dos experimentos de esquiva inibitória pelos alunos da rede pública, realização da leitura eletrofisiológica do zebrafish através do implante de eletrodos e filtros analógicos/digitais de acordo com o anexo 3 utilizando uma interface com o sistema android de modo a construir um leitor de sinais eletrofisiológicos portátil.

Disponibilizar no mercado os dois equipamentos desenvolvidos em parceria com a iniciativa privada no mercado.

## **9. ANEXOS**

Anexo 1

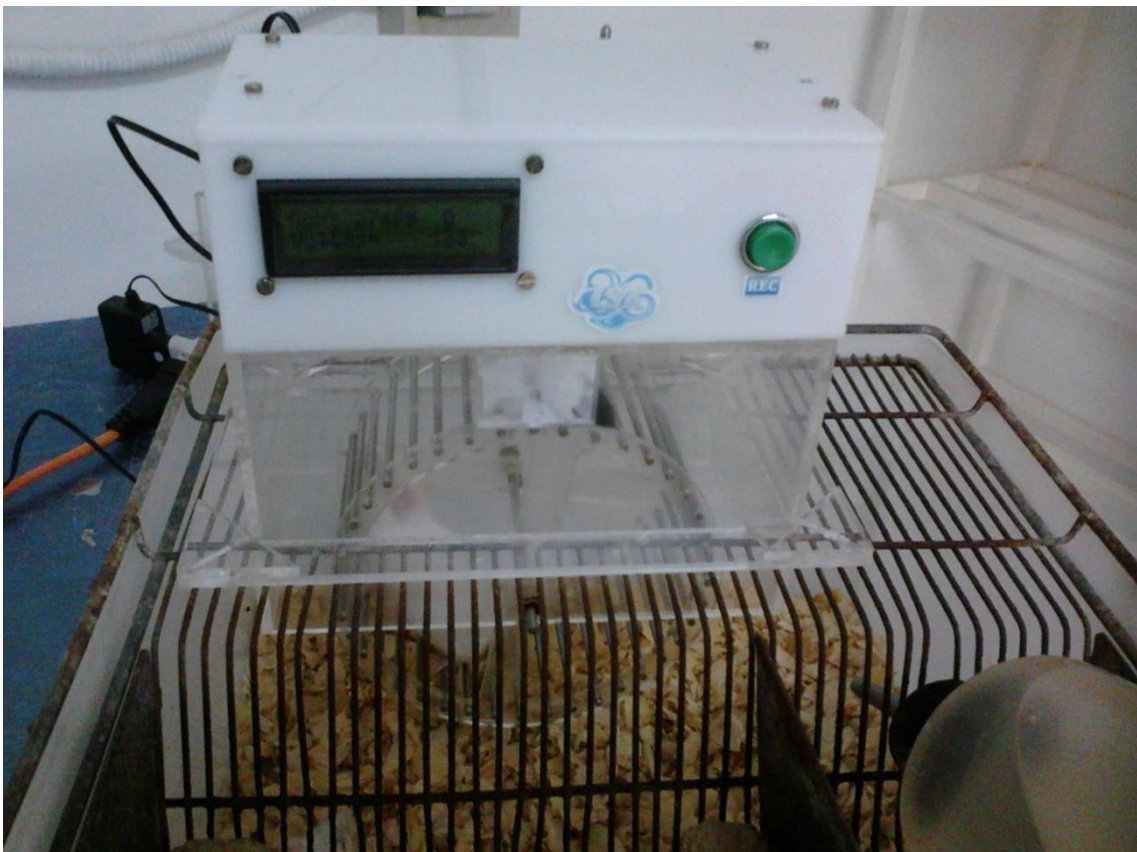
ANEXO 2- MANUAL DE UTILIZAÇÃO DO SISTEMA DE REGISTRO DE  
ATIVIDADES PARA CAMUNDONGOS



Semi-Automatic Wheel for Monitoring Mice Exercise Activity

**Operation Manual**

By Gilvan Luiz Borba Filho



Designed and developed by Eng. Gilvan Luiz Borba Filh

## Apparatus description

The Semi-Automatic Wheel for Monitoring Mice Exercise Activity is an apparatus designed to easily and automatically evaluate the mice voluntary exercise performance on a home cage wheel.

The apparatus (dimensions: 15x 25 x 30 cm, 1.4 kg) consist of a wheel (15 cm of diameter) coupled to an electronic operational system.

The wheel is made of stain steel bars connected by an acrylic support. It presents two opposite sensors that are recognized by the specific detector on the operational box.

The operational box presents a display screen, three buttons, a memory card, a memory card port and an electric energy plug.

- (1) Turn ON/OFF button.
- (2) Memory card: 2Gb, formatted FAT or FAT16. The system does not recognized FAT32 format.
- (3) Memory card port: to connect the memory card.
- (4) Red button: for start/reset the system.
- (5) Green button: to save the recordings in the memory card.

**Power Supplies:** The apparatus operates from 100V to 240V and 50-60Hz. It is desirable the use of no breaks to prevent losing data if a power interruption occurs during data acquisition.

## The operational system

The system counts the number of half laps by detecting the wheel sensors by a specific detector.

The recording data is based on the number of half laps that is detected during 32,600 CPI (cycles per instruction) which correspond to approximately 10 minutes. Based on this point, the minimum registration period for recording is 32,600 CPI. The system does not register the half laps if it stops before 32,600 CPI.

The system re-starts the count every 32,600 CPI. The number of half laps during each 32,600 CPI is register separated in a file in the memory card.

The data is saved in a file (.txt format) in the memory card, named Suisse0X.txt It can be opened in programs as Excel, Matlab, SiLab etc.

## How to use the Semi-Automatic Wheel for Monitoring Mice Exercise Activity

### 1. Activity recording

- a. Turn on the apparatus by pressing ON/OFF key button
- b. Put the memory card on the specific port with the contacts up.
- c. Press the red button to initiate recording. \*
- d. The activity recording occurs on an ongoing basis until the green button REC is pressed. It is extreme important to press the green button before take out the memory card. All data will be lost if the memory card is removed without pressing the green button.\*

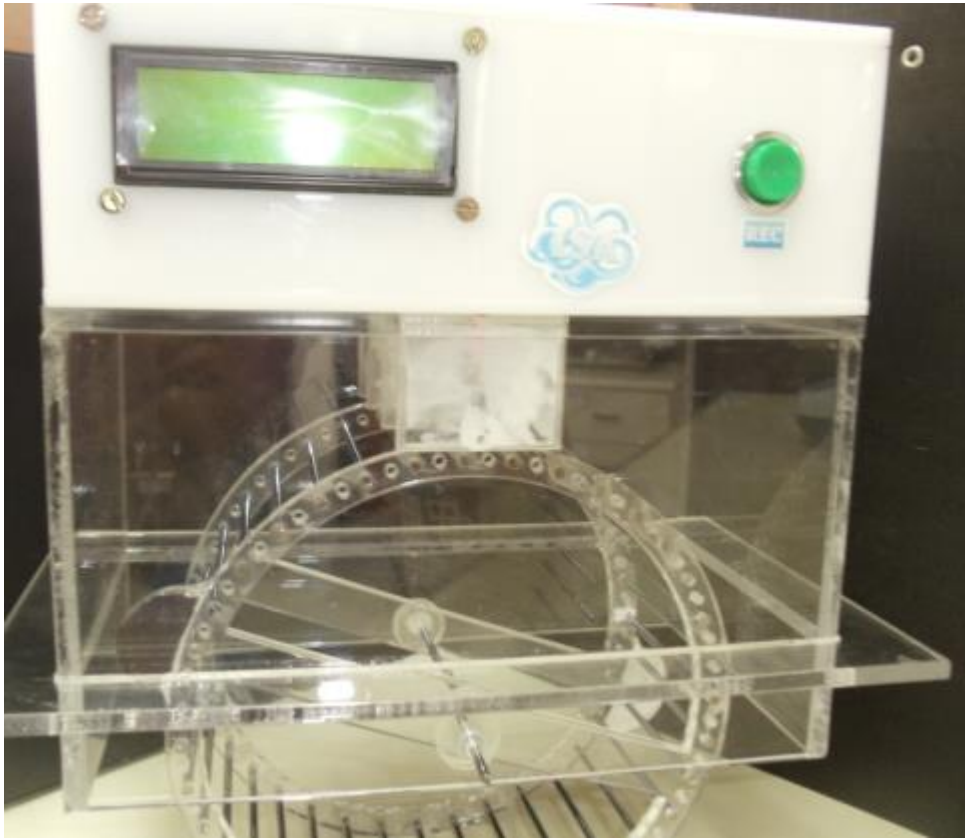
\* Take note of the date and time of starting/ending the data acquisition;

#### Processing the recorded data

2. Remove the memory card;
3. The data is saved in the memory card as a .txt file.
4. The file can be opened by any program such as Matlab, Silab, Excel, Word, etc;
5. Save the data in a personal computer or pen drive. Every time that green button is pressed or the memory card is removed and put it on again in the apparatus, the .txt file is replaced by a new one.

#### Descriptive figures

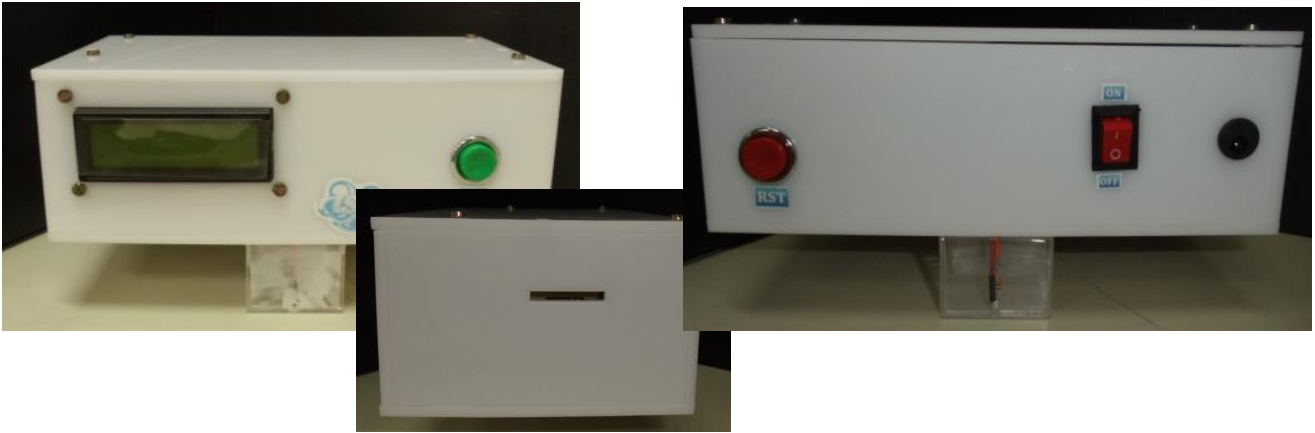
## 1. Hole apparatus



## 2. Wheel



### 3. Operational box (front, back,lateral)



### 4. Display



Blue arrow: CPI

Yellow arrow: number of half laps

Red arrow: shows the last value written on the card.

5. Memory card



6. The data file is saved in .txt format

7. Energy



TESTEC01  
Documento de texto  
3 KB

plug



How to analyze your data

Here we show an exemple of how the data can be analyzed in the Windows Excell. This Excell file is provide in the memory card.

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
<u>T.001</u>	R	Recording intervals	Dist (m)	Real time(h)	Total Dist (m)	Total Time(h)	N° Recordings	H1	H2
15	15	0:10:05	7,065	18:00	160,611	1:10:35	7	19/5/11 18:00	19/5/11 19:10
40	15	0:10:05	18,84	18:10					
57	15	0:10:05	26,847	18:20					
0	15	0:10:05	0	18:30					
73	15	0:10:05	34,383	18:40					
30	15	0:10:05	14,13	18:50					
126	15	0:10:05	59,346	19:00					

**Column A (Yellow):** is to be filled with the data recorded by the card. The column can be filled manually or the data can be imported directly through the file (.txt) in the memory card.

To import the data:

(1) Click with the right button in hyperlink T.001 in A1 cell (2) Import the txt file on the memory card.

**Column B:** is already filled with the diameter (15cm) of the wheel. It is important to allow the spreadsheet to plot the graph in meters. This number is fixed.

**Column C:** is already filled with the interval between recordings. The records are registered every 32,600 CPI (which is variable between 10 and 10:05 min). This number is calculated when you fill columns H,I and J.

**Column D:** shows the distance (in meters) for each recording intervals. It is automatically calculated when you fill the column A.

**Column E:** shows the real time of each recording interval. It is automatically calculated when you fill columns H, I and J.

**Column F:** shows the distance (in meters) of full recorded time. It is automatically calculated when you fill column A.

**Column G:** shows the total time (in hours) of recording. It is automatically calculated when you fill column I and H.

**Column H (Pink):** is to be filled with the number of recording intervals. This number will be used to correct precisely time between recordings.

**Column I (Blue):** is to be filled with the **date and time of the beginning of the record** (i.e. date 09/09/2011; hour 16:30:00).\*

**Column J (Green):** is to be filled with the **date and time of the ending of the record** (i.e., date 10/10/2011; hour 9:30:00).\*

\*The hour data must be accurately pointed. This will be used to correct the time of the recordings intervals and the range of x-axis of the graph.

### Errors messages



**Card Error:** In case of the card is not seated properly the system will display the message “Card Error”. In this case make sure the card was put through and it is with the electrical contacts up.

**Boot Problem:** The operational system only recognize memory card with FAT or FAT16 format. The original memory card provided with the Semi-Automatic Wheel for Monitoring Mice Exercise Activity is already ready to use (FAT format). The operational system will not recognize if a memory card with other format (i.e. FAT32) is inserted it. Thus, a Boot Problem message will appears in the display.

In this case, format the card in FAT or FAT16 format.

Importantly, no memory cards greater than 2 GB should be used.

## Anexo 3

### Projeto do Amplificador de Sinais Eletrofisiológicos para ZebraFish

Aluno: Eng. Gilvan Luiz Borba Filho

## Introdução

Nos últimos anos o estudo dos sinais eletrofisiológicos, em especial os neurais, vem sendo foco de grande estudo, com eles é possível avaliar o resultado de um fármaco ou de uma lesão, estudar o efeito de uma doença no padrão de disparo neural e com isso testar uma cura (Goldsmith<sup>1</sup> and Christian Jobin, 2012).

É impossível separar os avanços da área biomédica com os avanços tecnológicos atuais, de fato, são os avanços tecnológicos que impulsionam os avanços médicos. No campo da neurociência isso fica ainda mais evidente (Nicoletis, 2006).

Com os novos amplificadores operacionais, filtros e as novas tecnologias de conversão A/D os pesquisadores dispõe de uma vasta gama de modos de visualizar os sinais eletrofisiológicos.

Atualmente, uma nova ferramenta entrou no cenário na neurociência e da bioquímica, o zebrafish, conhecido no Brasil como paulistinha, por ser um peixe de pequeno porte e fácil manuseio o zebrafish vem ganhando espaço no estudo de fármacos, principalmente no de combate a sintomas de déficits na locomotivos e convulsões (Lee David Ellis, Kelly Howard Soanes, 2012). Nesse cenário a leitura dos padrões eletrofisiológicos do peixe se torna indispensável, no entanto, todos os equipamentos disponíveis no mercado são voltados à mamíferos de pequeno e médio porte.

E foi essa falta de suporte no estudo dos sinais com zebrafish que levou ao desenvolvimento desse projeto.

## Aquisição do Sinal

Para poder projetar um amplificador com um filtro ativo, temos, primeiro, que conhecer a natureza do sinal envolvido.

Para a aquisição de um sinal eletrofisiológico a natureza do sinal em si se torna um desafio, uma vez que a corrente que flui pelo sistema nervoso é uma corrente iônica e não elétrica (Kandel -2000).

De uma forma simplificada podemos descrever a geração dos sinais eletrofisiológicos como uma relação entre a entrada e saída de íons nas células nervosas. A figura abaixo ilustra a geração de um potencial em uma fibra nervosa pela entrada de sódio  $\text{Na}^+$  e a saída de potássio  $\text{K}^+$  (imagem do HowStuffWorks 2007).

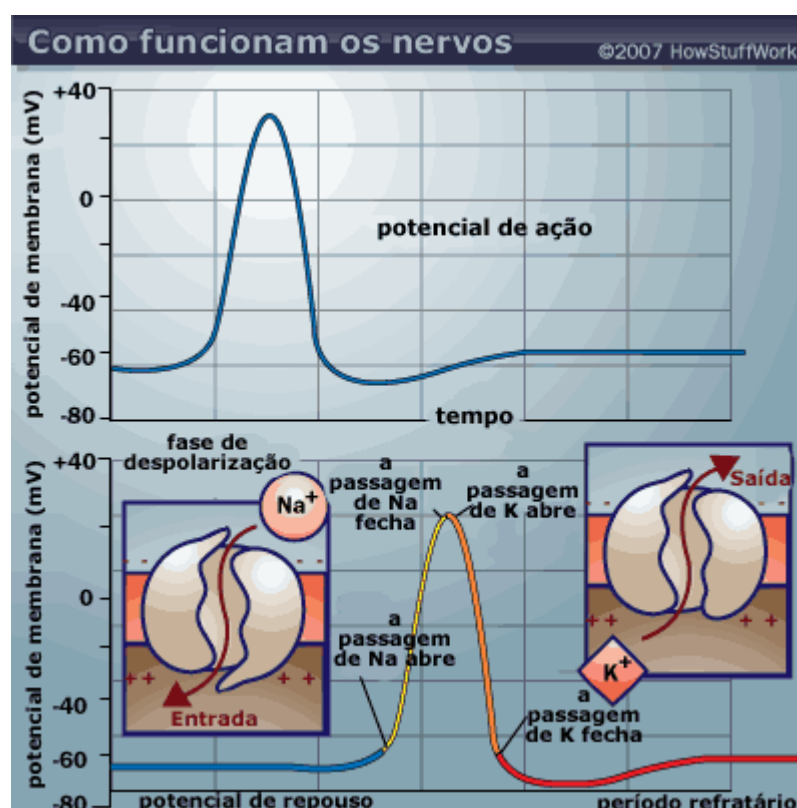


Figura 11 - Geração de um potencial de ação em uma fibra nervosa.



Para a leitura desses sinais um eletrodo é colocado próximo a fonte e uma referência é estabelecida por outro eletrodo em uma área próxima. A diferença de concentração iônica nas proximidades dos dois eletrodos resultará no sinal a ser lido, (Pineda 2011).

Devido a natureza do sinal, os eletrodos necessitam ter uma impedância elevada, ou serem desacoplados do sistema de aquisição, caso contrário a aquisição do sinal acaba por influenciar diretamente no mesmo. (Nicoletis 2006)

### Amplificador

Para o desacoplamento do sinal com o sistema de aquisição foram utilizados três amplificadores operacionais, de forma a se obter um amplificador operacional de instrumentação (Valkenburg, 1982).  
Figura abaixo:

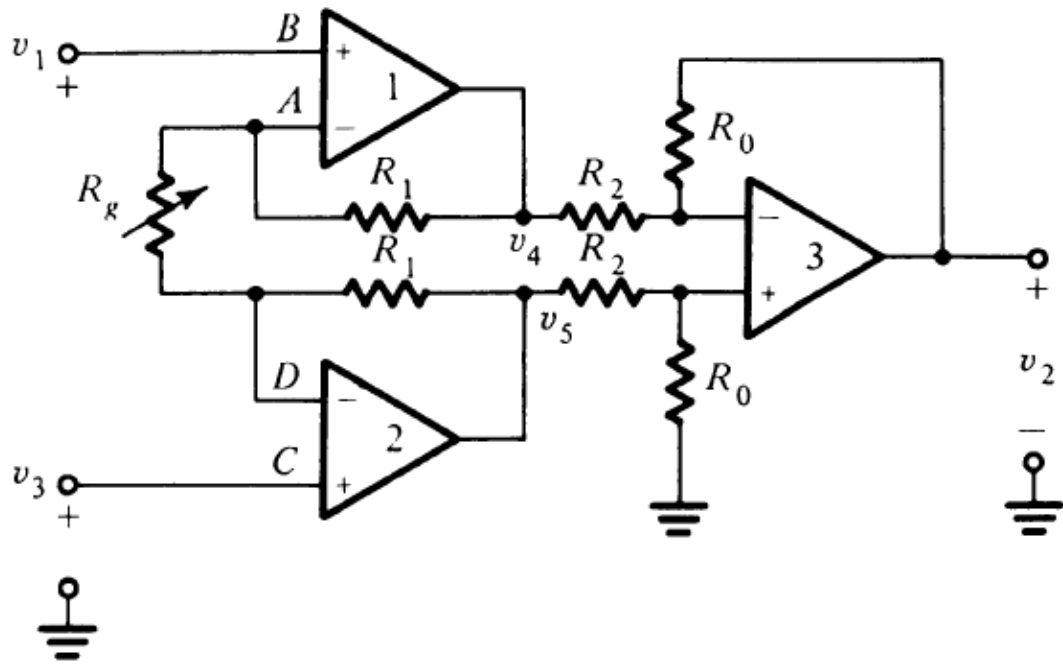


Figura 12-Diagrama de um amplificador de instrumentação.

Nesse circuito temos  $v_1$  e  $v_3$  como entrada,  $v_3$  sendo o eletrodo de referência ao sinal captado em  $v_1$ . Esse circuito tem como características a necessidade de uma baixíssima corrente na entrada e o ganho dado com a modificação de apenas um resistor, o  $R_g$ .

Como é característica dos amplificadores operacionais, a tensão entre os pontos A e B é a mesma, assim como a tensão entre C e D (Valkenburg, 1982). Dessa forma podemos estudar o comportamento do amplificador tirando as equações nos nós de  $v_4$  e  $v_5$ . Como a tensão em A é igual a tensão em B e igual  $v_1$ , e a tensão em C é igual a de D que é igual a  $v_2$ , temos :

$$v_4 = \left(1 + \frac{R_1}{R_g}\right) v_1 + \left(-\frac{R_1}{R_g}\right) v_3$$

$$v_5 = \left(1 + \frac{R_1}{R_g}\right)v_3 + \left(-\frac{R_1}{R_g}\right)v_1$$

$$v_2 = \frac{(-R_0)}{R_2}v_4 + \frac{R_0}{R_0 + R_2}\left(1 + \frac{R_0}{R_2}\right)v_5$$

$$v_2 = \left(1 + \frac{2R_1}{R_g}\right)\frac{R_0}{R_2}(v_3 - v_1)$$

Com  $R_0$  igual a  $R_2$  o ganho  $k$  fica igual á :

$$k = 1 + \frac{2R_1}{R_g}$$

Para o projeto adotaremos  $R_1 = 25K\Omega$  ,  $R_2 = R_0 = 40K\Omega$ , ficamos assim com o mesmo diagrama utilizado pela Texas Instruments no projeto do INA128, o ganho do amplificador de instrumentação será dado por:

$$k = 1 + \frac{50K\Omega}{R_g}$$

Nesse primeiro estágio de amplificação será dado um ganho de 10 vezes, 20dB/dec ,ou seja , o  $R_g$  será de 5,5K $\Omega$ . Esse circuito apresenta um ganho linear para a faixa de 0-500KHz, na temperatura de 25° e tensão de alimentação  $V_s = \pm 15V$ .

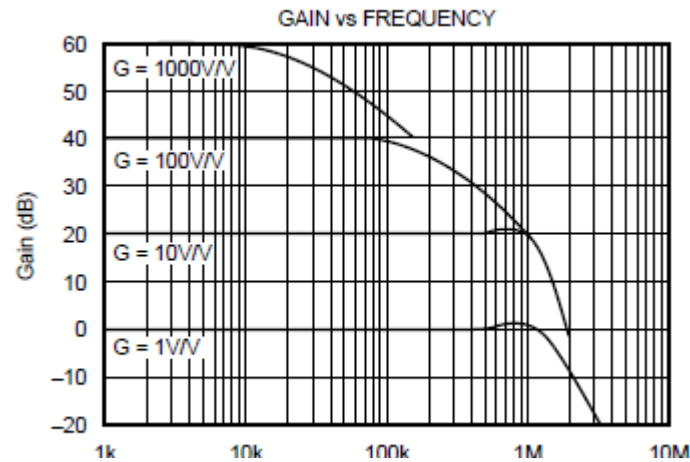


Figura 13 - Variação do ganho em função da frequência no circuito da fig 2.

## Filtro

Um dos problemas inerentes a aquisição de sinais neuronais é o ruído provocado pelos outros sinais eletrofisiológicos, batimento cardíaco, movimento muscular, movimento respiratório (Sharma et al, 2007).

No caso do zebrafish os batimentos cardíacos e o movimentos branquial são os responsáveis pela maior parte da contaminação do sinal (Pineda et al 2010). Esses dois estímulos ficam na faixa dos 0,5-3Hz, dessa forma um primeiro filtro foi projetado para filtrar esses ruídos já na aquisição do sinal, com um filtro passa baixa na saída para a referência.(INA128-Datasheet TI).

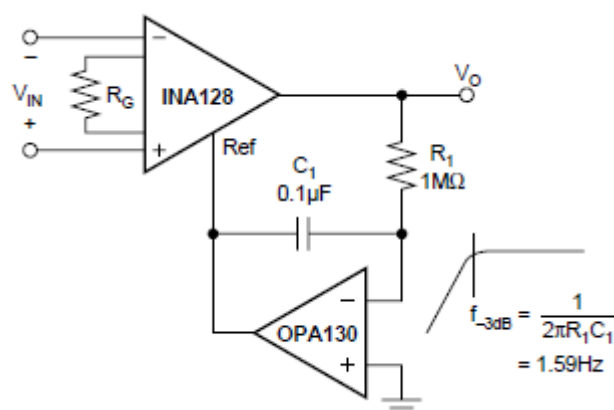


Figura 14 - Diagrama do amplificador de instrumentação com um filtro passa baixa na referência.

Com essa realimentação a saída passa a ser de um passa alta com frequência de corte de 1,59Hz. A equação de transferência da realimentação para a referência pelo filtro passa fica:

$$T_r(s) = \frac{1}{R.Cs} = \frac{1}{10^6 \cdot 10^{-4}s} = 0,01 \cdot s^{-1}$$

$$T(s) = 10 \cdot (1 - 0,01s^{-1})$$

No entanto apenas esse filtro não é suficiente, uma vez que a intensidade do ruído é muito superior, 20x, maior que o sinal neural, com isso a implementação de um filtro passa faixa de 3 a 20 Hz se torna necessário. Esse filtro tem que ter a frequência central  $w_0 = 53,4rad/s$  com um ganho de 60dB.

É interessante para esse filtro possuir uma assimetria, com a maioria dos polos e zeros agindo na baixa frequência, uma opção seria a função de transferência  $T(s)$  abaixo:

$$T(s) = \frac{ks^3}{(s + 19)^3(s + 125)^1}$$

Com  $w_p = 19rad/s$  e  $w_s = 125rad/s$ . Assim teríamos um ganho de 18dB/oct de 0 a 3 Hz e uma atenuação de 6dB/oct depois dos 20Hz. O projeto dessa parte do amplificador ficou por conta de dois colegas de curso.

## Referências

J. R. Goldsmith<sup>1</sup> and Christian Jobin, Think Small: Zebrafish as a Model System of Human Pathology, *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012.

Nicolelis, *Frontiers in Neuroscience* 2006.

Kandel, *Principles of Neural Science* 2000.

Lee David Ellis, Kelly Howard Soanes, PTZ vs therapeutics A larval zebrafish model of bipolar disorder as a screening platform for neuro-therapeutics, *Behavioural Brain Research*, 2012.

Ricardo Pineda, Christine E. Beattie, Charles W. Hall. Recording the adult zebrafish cerebral field potential during pentylenetetrazole seizures. *Journal of Neuroscience Methods* 2010.

M.E Van Valkenburg, *Analog Filter Design*, 1982.

Varsha Sharma , P. Prakash Babu , Arun Singh ,Sangeeta Singh ,Rameshwar Singh, Iron-induced experimental cortical seizures: Electroencephalographic mapping of seizure spread in the subcortical brain areas, *Seizure* 2007.

## ANEXO 4

## TESTE DE CONDUTIVIDADE

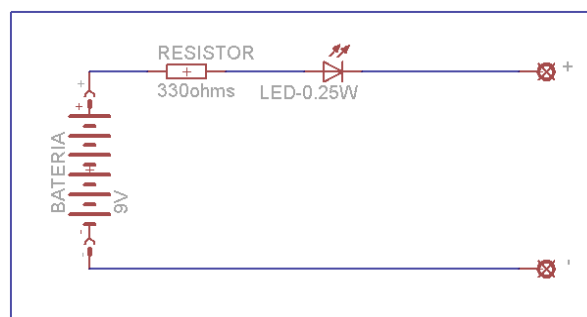
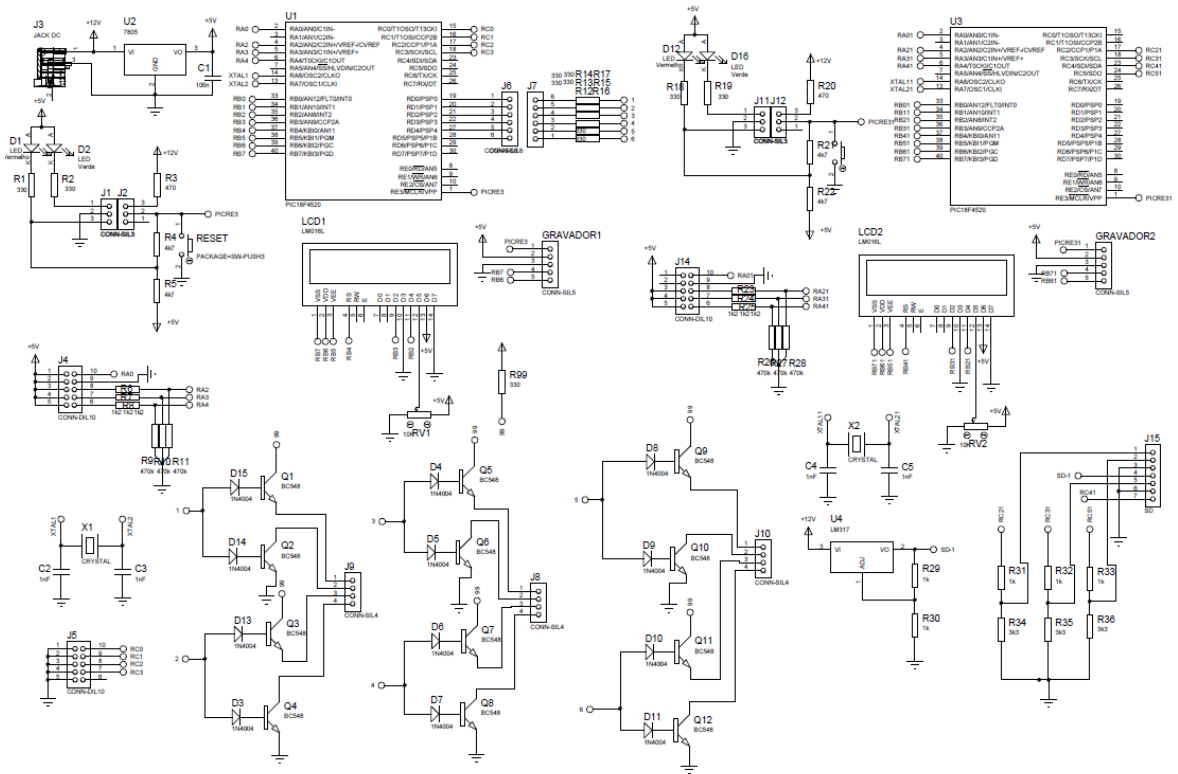


Figura 15 Diagrama do sistema de teste de condutividade.

- Bateria de 9V;
- Led 5mm;
- Clip para convecção da bateria;
- Fios flexível 0.5mm diversos;

## ANEXO 5 DIAGRAMA DO SISTEMA DE CONTROLE PARA A ESQUIVA PARA ZEBRAFISH



## ANEXO 6 CIRCUITO DO SISTEMA DE CONTROLE PARA A ESQUIVA INIBITÓRIA PARA ZEBRAFISH

