

EFEITOS DA OSMOLARIDADE SOBRE PARÂMETROS CINÉTICOS DA
ONDA DE DEPRESSÃO ALASTRANTE EM RETINA DE AVE

MICHELLE ALMEIDA VASCONCELOS

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DA COORDENAÇÃO DO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA, QUÍMICA E NEUROCIÊNCIAS DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
CIÊNCIAS EM NEUROFÍSICA.

Aprovada por:

Prof. Dr. Mário Antônio Duarte
(Presidente)

Prof. Dr. Jurandir Nadal

Prof. Dr. Paulo dos Santos Rodrigues

SÃO JOÃO DEL-REI, MG - BRASIL
ABRIL DE 2003

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

VASCONCELOS, MICHELLE

ALMEIDA

Efeitos da Osmolaridade sobre
Parâmetros Cinéticos da Onda de
Depressão Alastrante em Retina de Ave
[MG] 2003

XIII, 85 p. 29,7 cm (FIQUINE/UFSJ,
M. Sc., Neurofísica, 2000)

Dissertação – Universidade Federal
de São João del-Rei, FIQUINE

1. Medidas experimentais

I. FIQUINE/UFSJ II. Título (série)

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, pela constante presença em minha vida.

Ao professor Mário Antônio Duarte, muito mais do que um orientador, um amigo que certamente deixará saudades. Agradeço de coração pelo profissionalismo, dedicação, amizade e apoio nos momentos mais difíceis.

Ao professor João Domingos Scalon pelo exemplo de humildade, bom humor e pelo auxílio sempre que necessário. Ao professor Antônio-Carlos Guimarães de Almeida, pelos ensinamentos durante toda a caminhada.

Aos grandes amigos Rodrigo Seixas de Carvalho, Hewerson Zansávio Teixeira, Antônio Márcio Rodrigues e Elizabete Sousa Pinto pela amizade e por terem proporcionado um ambiente saudável. Aos amigos do LANECS (Laboratório de Neurociência Experimental e Computacional), Douglas, Marcelo, Lucélia, Pauliani, Ricardo e Hugo.

À Dona Helena pelo carinho, paciência e amizade e a todos aqueles funcionários que colaboraram, principalmente nos finais de semana, para que este trabalho se realizasse.

À secretária Inês, pela amizade, atenção e dedicação para comigo. Aos professores da Pós-graduação que, de alguma forma, contribuíram para concretização deste projeto.

Aos irmãos Fernando, Renato, Filipe e Lucas e ao meu pai João. Ao sobrinho Guilherme, motivo de felicidade com o seu nascimento. À família do Cleber e a todos os meus parentes que mesmo distantes sempre torceram por mim. Ao Lando e Maria, pelas incansáveis demonstrações de preocupação, cuidado e amor.

Aos amigos, alunos e professores de Itabira, cidade querida, que direta ou indiretamente acreditaram nessa conquista.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo indispensável auxílio financeiro.

Resumo da Dissertação apresentada à FIQUINE/UFSJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M. Sc.)

EFEITOS DA OSMOLARIDADE SOBRE PARÂMETROS CINÉTICOS DA ONDA
DE DEPRESSÃO ALASTRANTE EM RETINA DE AVE

Michelle Almeida Vasconcelos

Abril/2003

Orientador: Dr. Mário Antônio Duarte
Co-orientador: Dr. Antônio-Carlos Guimarães de Almeida
Co-orientador: Dr. João Domingos Scalon

Programa: Engenharia Biomédica

Neste trabalho, utilizou-se, como modelo experimental, retinas de ave, para estudar os efeitos da osmolaridade sobre parâmetros cinéticos da onda de depressão alastrante em retina de ave. As técnicas experimentais e computacionais utilizadas permitem a visualização de todas as camadas da retina, sem corte histológico, preservando a integridade do tecido. Foram investigadas as dependências espaço-temporais de parâmetros cinéticos da onda de DA, tais como: variação do espalhamento de luz que acompanha a reação; velocidade de propagação da onda; variações em picos do sinal óptico em função do comprimento de onda da luz incidente na faixa do verde (543,5 nm) e do vermelho (632,8 nm); comprimentos longitudinais dos picos máximos do sinal óptico e do potencial extracelular; amplitude do pico do potencial extracelular e a espessura da camada plexiforme interna. Para que tais parâmetros pudessem ser investigados, foram utilizadas técnicas de vídeo microscopia quando a retina de ave estava imersa em soluções normal, hipotônicas e hipertônicas. A osmolaridade das soluções foram variadas através da concentração de NaCl desde 140 até 60 mM. Todos os estudos foram feitos após o equilíbrio osmótico ter sido atingido. Os resultados deste trabalho apontaram uma dependência destes parâmetros com a concentração de NaCl além de possibilitar a confirmação de hipóteses existentes na literatura que associam a movimentação iônica, fluxo de água entre os meios extra e intracelulares e o comprimento de onda da luz incidente como causas das alterações no sinal óptico intrínseco que acompanha a onda de Depressão Alastrante em retina.

Abstract of Dissertation presented to FIQUINE/UFSJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M. Sc.)

EFFECTS OF OSMOLARITY ON KINETIC PARAMETERS OF SPREADING
DEPRESSION WAVE IN CHICKEN RETINA

Michelle Almeida Vasconcelos

April/2003

Advisor: Mário Antônio Duarte
Co-Advisor: Antônio-Carlos Guimarães de Almeida
Co-Advisor: João Domingos Scalon

Department: Biomedical Engineering

In this work, it was used isolated chicken retina as experimental model to study the effects of osmolarity on kinetic parameters of spreading depression wave in chicken retina. The experimental and computational techniques used in this work allow the visualization of all retina layers, without hystological cut, preserving the integrity of the tissue. It was investigated information about the temporal and spatial evolution of kinetic parameters, such as: light scattering changes accompanying the reaction; the wavefront velocity; changes on picks of the optical signal in function of two wavelength of the incident light (543.5 nm and 632.8 nm); longitudinal lengths of maxima picks of the optical signal and of the extracellular potential; intensity of the extracellular potential pick and the thickness of the inner plexiform layer. Such parameters could be investigated with video microscopy techniques when the chicken retina was immersed in standard, hypotonic and hypertonic solutions. The osmolarity of the solutions was changed by the concentration of NaCl in the range from 140 to 60 mM. All the studies were performed after the osmotic equilibrium has been reached. The results showed a dependence of these parameters with the NaCl concentration in the solutions and, moreover, allow the confirmation of existent hypotheses that relate the ionic movement, flow of water between the extra and intracellular media, and the wavelength of the incident light to causes of the alterations in the intrinsic optical signal that accompanies Spreading Depression in retina.

III.2.8 - POTENCIAL EXTRACELULAR	34
III.2.9 - ESPESSURA DA CAMADA PLEXIFORME INTERNA	37
III.2.10 - ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
CAPÍTULO IV - RESULTADOS EXPERIMENTAIS	38
IV.1 - ESPALHAMENTO DE LUZ NAS CAMADAS DA RETINA DURANTE A ONDA DE DA	38
IV.2 - VELOCIDADE DE PROPAGAÇÃO DA ONDA DE DA	41
IV.3 - EFEITO DA OSMOLARIDADE SOBRE O SINAL ÓPTICO INTRÍNSECO	43
IV.4 - COMPRIMENTO LONGITUDINAL DA FRENTE DE ONDA	48
IV.5 - POTENCIAL EXTRACELULAR	50
IV.6 - ESPESSURA DA CAMADA PLEXIFORME INTERNA	53
CAPÍTULO V - DISCUSSÃO	56
V.1 - ESPALHAMENTO DE LUZ NAS CAMADAS DA RETINA DURANTE A ONDA DE DA	56
V.2 - VELOCIDADE DE PROPAGAÇÃO DA ONDA DE DA	59
V.3 - EFEITO DA OSMOLARIDADE SOBRE O SINAL ÓPTICO INTRÍNSECO	63
V.4 - COMPRIMENTO LONGITUDINAL DOS PICOS DO SINAL ÓPTICO INTRÍNSECO	66
V.5 - POTENCIAL EXTRACELULAR	72
V.6 - ESPESSURA DA CAMADA PLEXIFORME INTERNA	75
V.7 - PROPOSTAS DE CONTINUIDADE	76
CAPÍTULO VI - CONCLUSÃO	79
CAPÍTULO VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

LISTA DE FIGURAS DO TEXTO

CAPÍTULO II

Figura II.1	- Diagrama representativo do olho dos vertebrados.	07
Figura II.2	- Imagem digitalizada das camadas da retina de ave.	07
Figura II.3	- Células de Müller e imagem digitalizada das camadas da retina de ave.	08
Figura II.4	- Fotografias da propagação da onda de DA na retina de ave.	10
Figura II.5	- Registros do potencial extracelular ao longo das camadas da retina de ave durante a onda de DA.	11
Figura II.6	- Dinâmica iônica e do potencial extracelular durante a onda de DA.	12
Figura II.7	- Morfologia padrão da seqüência do espalhamento de luz na IPL da retina.	14
Figura II.8	- Intensidades relativas dos picos máximos do sinal óptico.	15
Figura II.9	- Efeito da variação da osmolaridade da solução nutriente sobre o sinal óptico durante a passagem da onda de DA.	16
Figura II.10	- Registros de seqüências do espalhamento de luz obtidos a partir de retinas de ave sob diferentes condições.	17

CAPÍTULO III

Figura III.1	- Posicionamento da retina para experimentos de luz ortogonalmente espalhada.	21
Figura III.2	- Diagrama esquemático da montagem experimental para experimentos com iluminação com fontes de	23
Figura III.3	- Diagrama estrutural da montagem utilizada nos experimentos com retina de ave com fontes de	24
Figura III.4	- Diagrama do procedimento para determinação da velocidade da frente de onda.	28
Figura III.5	- Janela de amostragem definindo uma região de interesse na retina de ave.	29
Figura III.6	- Diagrama esquemático do procedimento para determinação do espalhamento de luz nas camadas da retina.	30
Figura III.7	- Janela de amostragem.	31
Figura III.8	- Emvolução do espalhamento de	36

Figura III.9	- Diagrama esquemático da montagem experimental para experimentos com iluminação com fontes de	23
Figura III.10	- Diagrama estrutural da montagem utilizada nos experimentos com retina de ave com fontes de	24
Figura III.11	- Diagrama do procedimento para determinação da velocidade da frente de onda.	28
Figura III.12	- Janela de amostragem definindo uma região de interesse na retina de ave.	29
Figura III.13	- Diagrama esquemático do procedimento para determinação do espalhamento de luz nas camadas da retina.	30
Figura III.14	- Janela de amostragem.	31
Figura III.15	- Emvolução do espalhamento de	36

Figura III.16 - Diagrama esquemático da montagem experimental para experimentos com iluminação com fontes de 23

Figura III.17 - Diagrama estrutural da montagem utilizada nos experimentos com retina de ave com fontes de 24

Figura III.18 - Diagrama do procedimento para determinação da velocidade da frente de onda. 28

Figura III.19 - Janela de amostragem definindo uma região de interesse na retina de ave. 29

Figura III.20 - Diagrama esquemático do procedimento para determinação do espalhamento de luz nas camadas da retina. 30

Figura III.21 - Janela de amostragem. 31

Figura III.22 - Emvolução do espalhamento de 36

CAPÍTULO IV

Figura IV.1	- Imagem digitalizada da frente de onda de DA.	38
Figura IV.2	- Evolução espacial e temporal do espalhamento de luz durante a onda de DA em condições normais.	39
Figura IV.3	- Evolução espacial e temporal do espalhamento de luz durante a onda de DA em condições hipo e hipertônicas.	40
Figura IV.4	- Imagem digitalizada da frente de onda e janela de amostragem da IPL.	41
Figura IV.5	- Propagação da velocidade de uma frente de onda de DA.	42
Figura IV.6	- Variação da intensidade do pico b do sinal óptico em função da concentração de NaCl no meio extracelular.	44
Figura IV.7	- Variação da intensidade do pico d do sinal óptico em função da alteração da osmolaridade do meio extracelular.	46
Figura IV.8	- Razão média entre os picos b e d do sinal óptico para soluções de diferentes concentrações de NaCl.	47
Figura IV.9	- Efeito da variação da concentração de NaCl sobre os comprimentos longitudinais dos picos c e d do sinal óptico.	50
Figura IV.10	- Amplitude do pico do potencial extracelular em função da concentração de NaCl.	52
Figura IV.11	- Comprimento longitudinal do potencial extracelular em função da variação da concentração de NaCl.	53
Figura IV.12	- Variação da espessura da IPL antes da passagem da onda de DA em função da osmolaridade do meio extracelular.	55

CAPÍTULO V

Figura V.1	- Registros das variações ópticas em retina de ave durante a passagem das ondas de DA em condições hipo e hipertônicas.	57
Figura V.2	- Evolução espacial e temporal do espalhamento de luz durante a onda de DA em condição hipertônica.	58
Figura V.3	- Velocidade de propagação da onda de DA em função da concentração de NaCl na solução nutriente.	60
Figura V.4	- Efeito da variação da solução nutriente sobre a velocidade de propagação da onda de DA.	61
Figura V.5	- Simulação da velocidade de propagação da onda de DA em função da redução de NaCl.	63
Figura V.6	- Intensidades relativas dos picos máximos do sinal óptico em função do comprimento de onda da luz incidente.	64
Figura V.7	- Razão média entre os picos b e d do sinal óptico para comprimentos de onda do incidente na faixa do vermelho e do verde.	66
Figura V.8	- Comprimento longitudinal do pico b do sinal óptico para soluções de osmolaridades diferentes.	67
Figura V.9	- Resultados da variação do comprimento longitudinal da frente da onda de DA em função da velocidade de propagação da reação.	69
Figura V.10	- Simulação da variação do comprimento da frente de onda em função da velocidade de propagação.	69
Figura V.11	- Registros do comprimento longitudinal da frente de onda de DA para as diferentes condições de composição iônica extracelular.	70

- Figura V.12 - Amplitude do potencial extracelular em retina de ave imersa em 74
soluções de diferentes concentrações.
- Figura V.13 - Potenciais registrados em neocórtex de rato com concentrações de 75
NaCl diferentes.

LISTA DE TABELAS DO TEXTO

CAPÍTULO IV

- Tabela IV.1 - Velocidade de propagação da onda de DA em retina de ave em função da concentração de NaCl na solução nutriente. 42
- Tabela IV.2 - Intensidade do pico **b** do sinal óptico em função da composição de NaCl. 43
- Tabela IV.3 - Intensidade do pico **d** do sinal óptico em função da concentração de NaCl. 45
- Tabela IV.4 - Razão entre os picos máximos do sinal óptico para cada condição de concentração de NaCl. 46
- Tabela IV.5 - Comprimento longitudinal dos picos b, c e d do sinal óptico em função da concentração de NaCl. 48
- Tabela IV.6 - Intensidade do potencial extracelular para cada concentração de NaCl. 51
- Tabela IV.7 - Comprimento longitudinal do potencial DC em função da osmolaridade do meio extracelular. 52
- Tabela IV.8 - Espessura da IPL antes da passagem da onda de DA em função da concentração de NaCl. 54

CAPÍTULO V

- Tabela V.1 - Comprimento longitudinal da frente de onda de DA e velocidade de propagação da reação em função da concentração de NaCl. 68

ABREVIATURAS

α-NS⁻	-	Íon (α -naftaleno-sulfonato)
DA	-	Depressão Alastrante
DP	-	Desvio Padrão
ETEL	-	Evolução Temporal e Espacial do Espalhamento de Luz
HSI	-	Sistema de Imagens ()
IOS	-	Sinal Óptico Intrínseco ()
IPL	-	Camada Plexiforme Interna ()
PFO	-	Perfil da Frente de Onda
RGB	-	Padrão de cores utilizado em imagens ()
RVD	-	
RVI	-	
SAE	-	Sistema Auxiliar de Experimentos
SN	-	Solução Nutriente Normal
SNC	-	Sistema Nervoso Central
TEA⁺	-	Íon (Tetraetilamônio)
UFSJ	-	Universidade Federal de São João del-Rei

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

I.1 - HISTÓRICO

O fenômeno da depressão alastrante (DA) foi descoberto pelo brasileiro Aristides Azevedo Pacheco Leão em 1944 (LEÃO, 1944), durante a investigação dos efeitos de uma estimulação local sobre as oscilações elétricas espontâneas em córtex cerebral de coelho. Leão verificou que o estímulo em uma região da superfície cortical provocava depressão da atividade elétrica e que esta depressão se alastrava lentamente para regiões adjacentes àquela de estímulo, justificando a escolha da expressão “depressão alastrante da atividade elétrica” para designar o fenômeno.

A onda de DA foi caracterizada, principalmente, pela variação lenta e reversível do potencial extracelular, predominantemente negativo, e exibe propagação autônoma independente do estímulo utilizado para sua deflagração (LEÃO, 1947). Posteriormente, a associação entre a onda de DA e uma despolarização das membranas de células neuronais e gliais foi comprovada (NEWMAN, 1989), além de uma intensa movimentação de água e íons entre os meios extra e intracelulares decorrente da alteração da permeabilidade sofrida pelas membranas durante a reação (MARTINS-FERREIRA e OLIVEIRA CASTRO, 1966).

A partir da descoberta do fenômeno, vários pesquisadores começaram a investigar a natureza dos processos envolvidos. LEÃO e MARTINS-FERREIRA (1953) registraram, pela primeira vez, o aumento da impedância elétrica do tecido cortical durante a passagem da onda de DA, mostrando que propriedades elétricas passivas do tecido neural também eram alteradas.

Aristides Leão relatou que Grafstein (GRAFSTEIN, 1956) registrou, através de microeletrodos, uma rápida e intensa atividade neuronal junto à frente de onda. Esta atividade indicaria a natureza epileptiforme do fenômeno da depressão alastrante (LEÃO, 1972). Leão ainda relatou que durante a depressão da atividade elétrica espontânea, identificava-se uma atividade “anormal” cujas propriedades epileptiformes

poderiam ser reconhecidas, sendo que, quando intensa, era similar às descargas convulsivas corticais. Contudo, a importância da DA não se limita aos estudos ligados à epilepsia. A reação tem sido aplicada como instrumento de grande préstimo nos estudos relacionados com a organização funcional do cérebro e em investigações relativas ao comportamento dos animais, uma vez que deprime funcionalmente a estrutura neural por ela atingida. Sendo um fenômeno reversível, há recuperação funcional da estrutura envolvida, o que possibilita a reavaliação dos resultados experimentais, superando, dessa forma, o método irreversível e traumático que utiliza a remoção cirúrgica para estudos dessa natureza (BURES , 1974).

Evidências foram relatadas por MILNER (1958) sobre a participação da onda de DA no processo fisiopatológico da enxaqueca, tais como a similaridade entre a seqüência de escotomas cintilantes advinda de pacientes em crise e as características dinâmicas da propagação da onda.

Em 1958, retinas de rã foram utilizadas por Peter Gouras (GOURAS, 1958) como modelo experimental do tecido cortical para estudo da atividade epilética. Este pesquisador demonstrou que a retina, de origem embrionária semelhante à do cérebro, é também susceptível ao fenômeno.

No início da década de 60, Martins-Ferreira (DO CARMO, 1987), em seus estudos sobre a DA e a organização do Sistema Nervoso Central (SNC), reproduziu o fenômeno de Leão , demonstrando que a onda de DA na retina de ave possuía características similares àquelas que ocorriam em outras estruturas do SNC. Este pesquisador desenvolveu uma solução salina apropriada para manter as retinas vivas e em bom estado e, ao mesmo tempo, susceptíveis ao fenômeno que, sob estas condições, podia ser provocado regularmente durante várias horas, através de estímulo mecânico, óptico, elétrico ou químico. A onda deflagrada, de aspecto opalescente, podia ser vista a olho nu ou com microscópio de baixa ampliação, iniciando na região de estímulo e propagando-se em todas as direções. Esta onda foi associada a alterações da intensidade do espalhamento de luz no tecido. A hipótese do autor era que a dinâmica do espalhamento de luz estaria relacionada com as variações na geometria do tecido, bem como com as mudanças eletrolíticas nos meios extra e intracelulares.

MARTINS-FERREIRA (1994) relata que os pesquisadores B. Deslisle Burns e B. Grafstein foram os primeiros a sugerirem hipóteses sobre os mecanismos de propagação da onda de DA. Seus estudos baseavam-se em experimentos nos quais os íons K^+ estavam envolvidos na deflagração do fenômeno. A idéia era que uma brusca liberação de potássio para o meio extracelular causava uma despolarização em neurônios adjacentes que, por sua vez, liberavam mais potássio para o meio em atividade de propagação, de tal maneira que o processo poderia se tornar auto-sustentado.

Já em 1966, a seqüência do sinal óptico durante a onda de DA foi descrita por MARTINS-FERREIRA e OLIVEIRA CASTRO (1966). A seqüência do espalhamento independe da direção de propagação da onda, sendo o sinal composto por quatro picos, dois máximos e dois mínimos. Os pesquisadores demonstraram que variações na camada plexiforme interna (IPL) da retina contribuíam para alterações no espalhamento de luz e que estas alterações estavam também relacionadas a características morfológicas da retina. Além disso, baseados em dados experimentais, sugeriram que a dinâmica do sinal dependia diretamente da osmolaridade e da temperatura da solução na qual a retina está imersa.

Em 1967, registros do transporte de eletrólitos e água entre os meios extra e intracelulares, durante a propagação da onda de DA, foram feitos por VAN HARREVELD e KHATTAB (1967), através do registro da impedância cortical. Esses pesquisadores mostraram a ocorrência de uma variação reversível do espaço extracelular durante a passagem da onda, dando início à observação dos efeitos do fenômeno sobre a geometria do tecido.

OLIVEIRA CASTRO e MARTINS-FERREIRA (1970) mostraram que as variações do volume e da espessura da retina de ave, durante a onda de DA, eram concomitantes com a reação. Além disso, observaram que as alterações na osmolaridade da solução de perfusão causavam mudanças na geometria da retina, independente da presença da onda de DA. Segundo os autores, tanto as variações no espalhamento de luz quanto na geometria da retina poderiam ser explicadas pela movimentação de água entre os componentes do tecido.

Já em 1974, uma técnica foi desenvolvida por MARTINS-FERREIRA (1974) possibilitando o estudo dos principais fatores responsáveis pela propagação da onda de DA. A técnica permitia eliminar as prováveis interferências dos estímulos sobre as características do fenômeno, através da denominada onda de DA circulante que, uma vez iniciada, propagava-se por várias horas com velocidade constante. Martins-Ferreira e seu grupo verificaram que a velocidade da onda apresentava alterações peculiares em função das condições experimentais como, por exemplo, composição e temperatura da solução nutriente.

DO CARMO e MARTINS-FERREIRA (1984) utilizaram microeletrodos íon-seletivos na realização de experimentos. Os pesquisadores definiram o perfil do potencial extracelular ao longo das camadas da retina, a movimentação iônica durante a onda de DA, além da variação do volume do espaço extracelular. A IPL foi identificada pelos autores como sendo a região onde a manifestação do fenômeno era mais intensa. A relação entre a variação da osmolaridade da solução de imersão da retina e a susceptibilidade do tecido para a reação foi estabelecida.

No ano seguinte, OLIVEIRA CASTRO (1985) desenvolveram um trabalho sobre o sinal óptico na retina durante a passagem da onda de DA. Os autores apontaram uma forte dependência entre esse sinal e o comprimento de onda da luz incidente, medindo a luz refletida do tecido. Os registros mostraram que os dois picos máximos do sinal apresentavam comportamentos diferentes em função do comprimento de onda da luz incidente. Dessa forma, os autores sugeriram que mecanismos distintos refletiam sobre os dois picos durante a onda de DA, estando o primeiro relacionado com a forte movimentação iônica na frente de onda e o segundo com o metabolismo do tecido. Além disso, observaram que alterações na osmolaridade da solução nutriente provocavam variações na transparência da retina e, conseqüentemente, mudanças no espalhamento de luz.

Em 1986, LUX (1986) estudaram as variações iônicas e alterações da geometria do espaço extracelular durante a atividade epiléptica. Os pesquisadores mostraram a existência da relação entre o fluxo de água com resultantes alterações da geometria do espaço extracelular e a movimentação iônica provocando variações na osmolaridade dos meios extra e intracelulares.

MARROCOS e MARTINS-FERREIRA (1990) descreveram o efeito da alteração na concentração de NaCl utilizada na solução de imersão da retina de ave sobre a velocidade de propagação da onda de DA. Os autores verificaram uma relação inversamente proporcional entre esses parâmetros, de modo que um decréscimo na concentração de NaCl, por exemplo, causa um aumento na velocidade de propagação. Além disso, eles demonstraram que existe uma forte influência da redução do íon cloreto na solução nutriente na velocidade de propagação da onda. A redução progressiva na concentração do íon cloreto na solução causou um aumento na velocidade. Por outro lado, a redução do íon sódio na solução nutriente causou um efeito menor sobre esses mecanismos de propagação, sugerindo que a reação não é necessariamente dependente deste íon.

A partir da década de 90, a associação de vídeo microscopia e registros eletrofisiológicos intracelulares transformou-se em uma ferramenta poderosa para o estudo de fenômenos complexos, como a DA, em diversas escalas de tempo e espaço, permitindo o acompanhamento de ondas em várias situações experimentais. Ainda nesta década, se iniciam estudos de parâmetros intracelulares que vêm se consolidando através da utilização de sondas ópticas íon-seletivas. DUARTE (2000) apresenta uma técnica para o estudo do sinal óptico intrínseco durante a onda DA, através da medição da luz refratada ou ortogonalmente espalhada pela retina. Essa técnica experimental associada a procedimentos computacionais justificam a monitoração de tecidos excitáveis durante diferentes tipos de atividades neuronais prolongadas tais como a Depressão Alastrante de Leão.

I.2 - OBJETIVO

O objetivo central do trabalho é investigar as dependências espaço-temporais de parâmetros cinéticos da onda de DA utilizando técnicas de vídeo microscopia, quando a retina de ave estiver imersa em soluções hipotônicas e hipertônicas, em condições de equilíbrio osmótico. Para tal, parâmetros como velocidade de propagação, potencial extracelular e sinal óptico intrínseco serão segmentados e a dinâmica de cada segmento será associada com a variação da osmolaridade extracelular. Esta investigação poderá permitir uma descrição dos sinais óptico e elétrico relacionando-os com alterações que ocorrem na retina durante a onda de DA.

CAPÍTULO II - BASES TEÓRICAS

II.1 - A RETINA

O olho dos vertebrados, representado na figura II.1, atua como uma câmera fotográfica biológica, de dimensões reduzidas, cuja função é formar uma imagem na película constituída pela retina. Deste modo, o olho funciona como um sistema constituído por duas lentes principais, a córnea e o cristalino, que provocam a refração dos raios luminosos em direção a um eixo óptico e a sua focagem, projetando uma imagem reduzida e invertida na camada fotoreceptora da retina. O processamento das informações envolvidas em uma imagem ocorre na retina, que é composta, conforme mostrado na figura II.2, por camadas denominadas, do interior para o exterior do olho, de:

- camada ganglionar, constituída pelos corpos celulares da camada mais interna da retina;
- camada plexiforme interna, onde ocorrem as sinapses entre células ganglionares e axônios das células bipolares, além dos processos das células amácrinas;
- camada nuclear interna, constituída pelos corpos celulares das células bipolares, horizontais (parte externa) e amácrinas (parte interna), e núcleos das células de Müller;
- camada plexiforme externa, onde ocorrem as sinapses entre fotoreceptores e células bipolares, além dos processos das células horizontais;
- camada nuclear externa, constituída pelos corpos celulares das células receptoras;
- camada dos fotoreceptores, também constituída pelos corpos celulares das células receptoras e dos segmentos externos.

A retina de vertebrados pode ser considerada como uma amostra do tecido cerebral, porém existem aspectos que os distinguem, como, por exemplo, as células gliais da retina (NEWMAN, 1989). Na maioria dos tecidos do SNC, astrócitos e

oligodendrócitos constituem a maioria das células gliais. Na retina, a célula de Müller é a principal célula glial e apresenta-se disposta radialmente atravessando todas as camadas, tendo seu núcleo situado na camada nuclear interna. Na figura II.3A estão representadas células de Müller típicas da retina de ave.

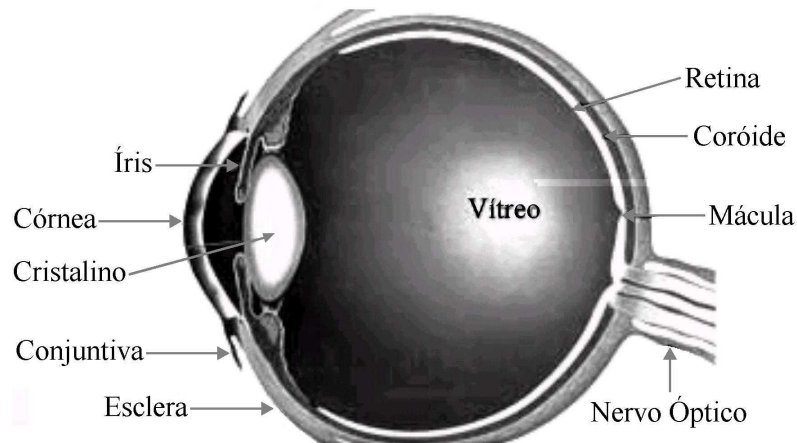


Figura II.1 - Diagrama representativo do olho dos vertebrados. Fazem parte do olho as estruturas: **Íris**: regula a quantidade de luz que entra no globo ocular, funcionando como um diafragma de câmara fotográfica; **Córnea**: membrana mais anterior e transparente do globo ocular; **Cristalino**: lente situada atrás da íris, cuja principal função é a focagem fina das imagens na retina; **Conjuntiva**: camada fina, transparente e com muitos vasos, que recobre a esclera na parte anterior do olho e a parte interna das pálpebras; **Esclera**: responsável pela proteção das estruturas internas ao olho; **Vítreo**: gel transparente que preenche e nutre o olho; **Retina**: formada por células sensíveis à luz (cones e bastonetes) que recebem a luminosidade. Esta informação posteriormente é levada até o cérebro através do **Nervo Óptico**; **Coróide**: formada por vasos e responsável pela nutrição da retina; **Mácula**: região central da retina com particular importância na visão fina da forma e da cor.

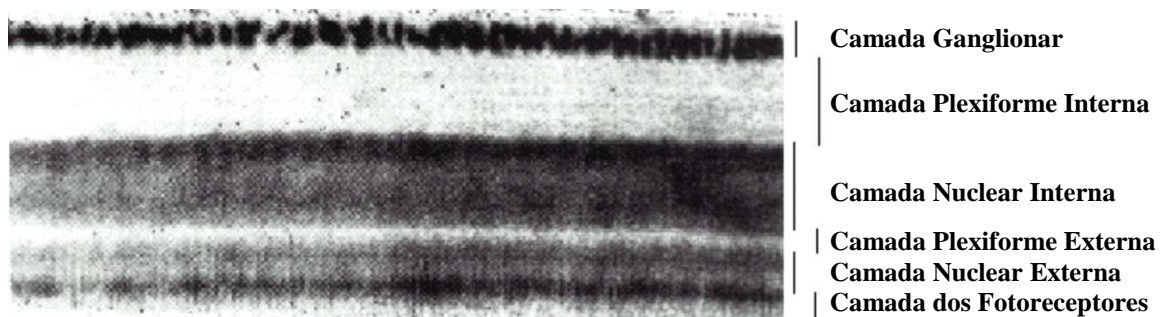


Figura II.2 - Imagem digitalizada das camadas da retina de ave e respectivas denominações (Adaptada de LADEWIG, 1998).

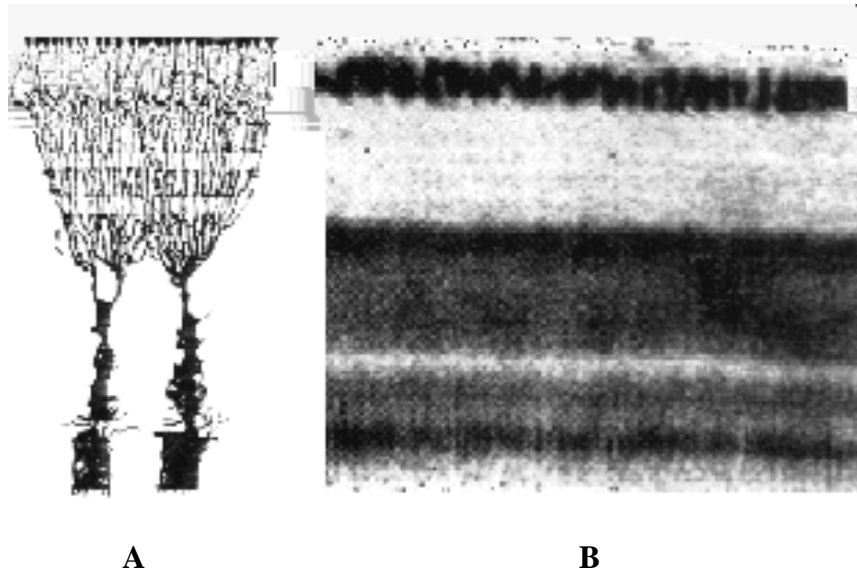


Figura II.3 - **A:** Células de Müller da retina de ave (Adaptada de NEWMAN, 1989).
B: Imagem digitalizada das camadas da retina de ave. (Adaptada de LADEWIG, 1998)

Stephen Kuffler, em 1965, estudou as propriedades fisiológicas das membranas de células gliais, contribuindo consideravelmente para o avanço da Neurociência que, até então, considerava as unidades neuronais como os elementos fundamentais dos tecidos neuronais. Este pesquisador demonstrou a permeabilidade seletiva da membrana de glia ao íon potássio, tanto de vertebrados quanto de invertebrados. No ano seguinte, foi postulado por KUFFLER (1966) e ORKAND (1966) que as células gliais têm uma importante função na regulação da concentração extracelular do íon potássio, através do mecanismo conhecido como tamponamento espacial de K^+ (K^+

). Esse mecanismo, segundo WALZ (2000), baseia-se na tendência das membranas vizinhas, em um sincício funcional, apresentarem uma característica isopotencial. Dessa forma, se a concentração de potássio extracelular aumenta em uma determinada região, o potencial de equilíbrio do íon torna-se mais positivo que o potencial de membrana, resultando no influxo de potássio devido à alta permeabilidade da membrana a esta espécie iônica. Por meio das K^+ channels, a corrente de K^+ será distribuída para outras partes do sincício. Devido à tendência do sincício permanecer isopotencial, em regiões distais àquela submetida ao aumento da concentração de K^+ , o potencial de equilíbrio deste íon torna-se mais negativo que o potencial de membrana. Conseqüentemente, nestas regiões, haverá o efluxo de K^+ que é, então, transportado

para uma região extracelular com baixa concentração a partir de outra região cuja concentração é alta.

II.2 - DEPRESSÃO ALASTRANTE EM RETINA

A onda de DA foi detectada, além do córtex, em várias outras estruturas neurais como bulbo olfatório (LEÃO, 1963), medula espinhal (STREIT, 1995) e a retina (GOURAS, 1958). Segundo MARTINS-FERREIRA (1983), para o estudo do fenômeno de Leão, a retina é particularmente favorável devido:

- à localização anatômica de seus elementos, permitindo um isolamento do tecido nervoso com menos danos do que qualquer outra região do SNC;
- à sua estrutura laminar ser similar a outras regiões do SNC, apresentando camadas plexiformes bem definidas, com sinapses e pequenos processos gliais;
- à sua relativa transparência à luz visível devido a localização “invertida” das células receptoras;
- à sua pequena espessura, podendo ser vista como uma fatia natural do tecido;
- à ausência de vasos sanguíneos, em particular na retina de ave, garantindo a sua integridade funcional pelo transporte de fluidos na interface com o meio extracelular;
- à facilidade com que sucessivas ondas de DA são provocadas por várias horas quando a retina está imersa em solução nutriente apropriada.

De acordo com MARTINS-FERREIRA (1983), as características da onda de DA em retina são idênticas às aquelas observadas no córtex, como:

- velocidade de propagação da mesma ordem de grandeza;
- variação lenta, negativa e reversível do potencial extracelular, com amplitude e dinâmica temporal similares;
- aumento reversível da impedância elétrica do tecido;
- existência de um período refratário na faixa de minutos;

- susceptibilidade à razão $[K^+] / [Mg^{2+}]$ no meio extracelular;
- variação do volume do tecido durante a reação.

Apesar das similaridades com o córtex, a retina destaca-se por apresentar variações visíveis das propriedades ópticas do tecido durante a onda de DA (MARTINS-FERREIRA e OLIVEIRA CASTRO, 1966), resultando em alterações no espalhamento de luz que compõem o sinal óptico intrínseco (IOS). Este sinal pode ser observado a olho nu ou por meio de microscópio de baixa ampliação e identifica-se por uma onda circular “leitosa” que se afasta do ponto de estímulo para regiões adjacentes, como mostrado na figura II.4.

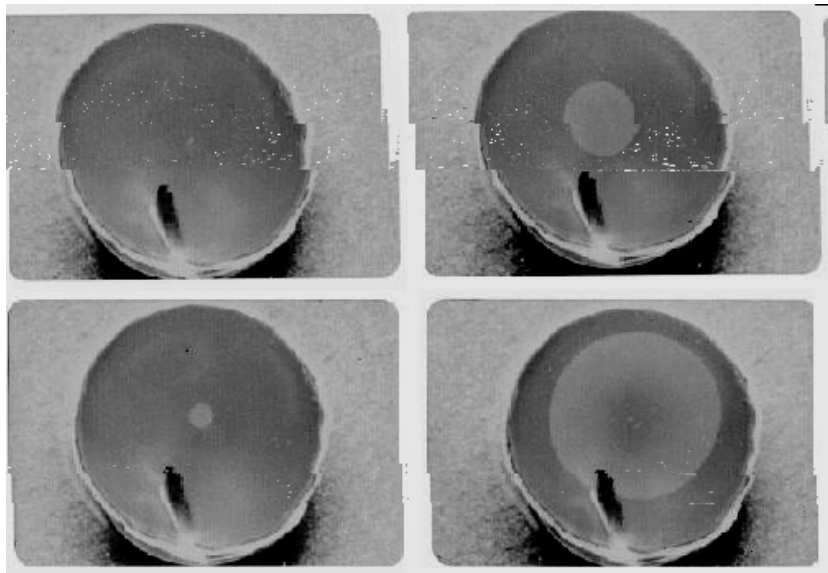


Figura II.4 - Fotografias, em diferentes intervalos de tempo, da propagação da onda de DA acompanhada de um sinal óptico (área circular mais clara) em retina de ave no hemisfério inferior do calota ocular imersa em solução nutritiva. No canto superior esquerdo, tem-se a fotografia do hemisfério inferior antes do estímulo; e, verticalmente, 17, 40 e 100 s após estímulo mecânico na área correspondente ao centro da onda “leitosa”. Observa-se o início e a recuperação da região onde a onda foi iniciada. (Adaptada de MARTINS-FERREIRA, 2000)

Para registros do potencial extracelular, movimentações iônicas com microeletrodos íon-seletivos, variações do IOS e alterações da geometria, experimentos com ondas de DA podem ser realizados tanto com a retina na calota ocular quanto com a retina (ou um fragmento dela) removida e separada de outras membranas da calota ocular.

As variações lentas do potencial extracelular, descritas originalmente por LEÃO (1947), têm as propriedades dos chamados campos potenciais (MARTINS-FERREIRA, 1983), que são gradientes de potencial causados por fluxos iônicos através do espaço extracelular, associados à passagem da onda de DA.

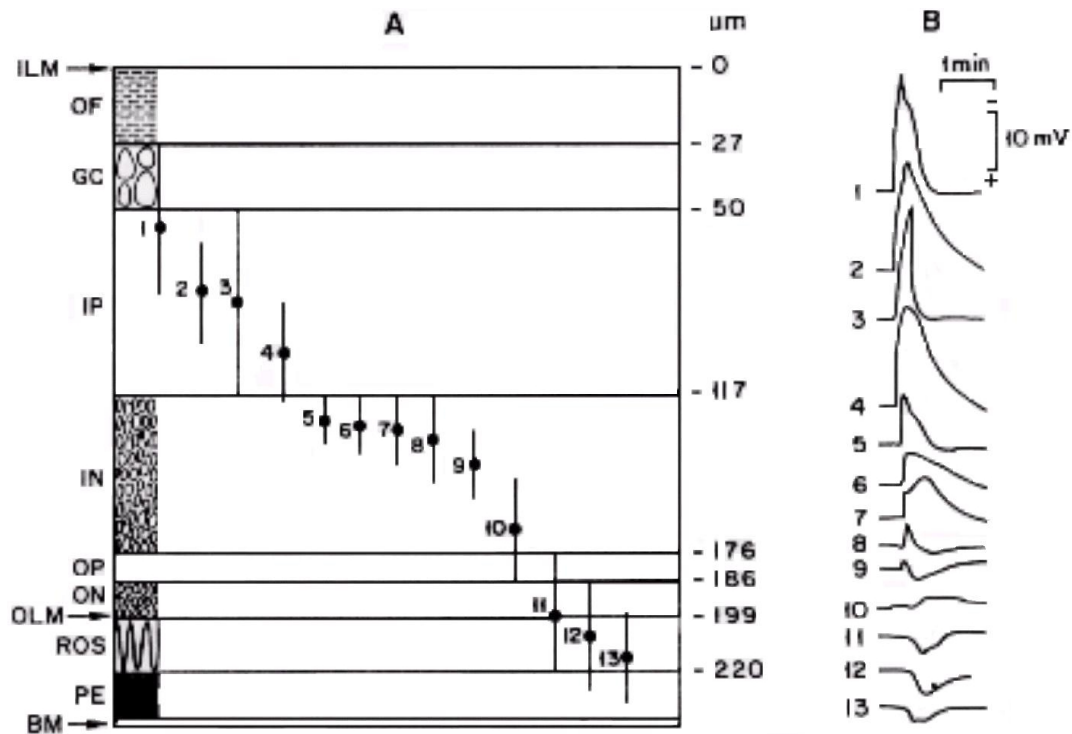


Figura II.5 - Registros do perfil de potencial ao longo das camadas da retina. **A** - Diagrama esquemático da retina de ave mostrando a localização de 13 regiões de medida (linhas verticais indicam a dimensão radial de cada região). As camadas estão identificadas como: ILM, membrana limitante interna; OF, camadas de fibras ópticas; GC, camada de células ganglionares; IP \equiv IPL, camada plexiforme interna; IN, camada nuclear interna; OP, camada plexiforme externa; ON, camada nuclear externa; OLM, membrana limitante externa; ROS, segmentos receptores externos; PE, pigmentos epitélicos; BM, membrana de Bruch. A escala indica a espessura (μm) das camadas da retina, relativa a espessura total da retina compreendida entre a ILM e a borda externa do ROS no nível da calota polar. **B** - Potenciais registrados nos pontos correspondentes indicados em A. Deflexões para cima da linha de base são negativas e para baixo positivas. (Adaptada de DO CARMO e MARTINS-FERREIRA, 1984)

Em retina, o potencial extracelular é medido inserindo-se um microeletrodo na camada de interesse. O microeletrodo é preenchido com solução salina que pode ser de NaCl, KCl ou a própria solução nutriente. A figura II.5 mostra registros do perfil de potencial, ao longo das camadas da retina de ave, obtidos por DO CARMO e

MARTINS-FERREIRA (1984). Observa-se que a amplitude máxima do potencial ocorre na região central da IPL, cujo valor encontra-se na faixa de 20 a 25 mV. À direita desta figura são mostradas as formas de onda, típicas dos potenciais.

As movimentações iônicas e alterações do pH do espaço extracelular,

Além disso, a análise da distribuição dos íons TEA^+ (tetraetilamônio) e $\alpha\text{-NS}^-$ (α -naftaleno-sulfonato), que se relaciona com variações no volume do espaço extracelular durante a onda de DA, foi feita por DO CARMO e MARTINS-FERREIRA (1984). Esses pesquisadores verificaram que, quando em baixas concentrações e em equilíbrio com o meio extracelular, as alterações em suas atividades indicavam o movimento de água do meio extra para os intracelulares, possibilitando, portanto, o registro de aumentos ou reduções nas dimensões do espaço extracelular do tecido.

II.3 - ESPALHAMENTO DE LUZ NA RETINA DURANTE A ONDA DE DA

A evolução temporal do espalhamento de luz na retina, que acompanha a onda de DA, foi primeiramente determinada por MARTINS-FERREIRA e OLIVEIRA CASTRO (1966), medindo-se a intensidade de luz espalhada pela retina em uma pequena área de observação. A figura II.7 apresenta a morfologia típica da seqüência do espalhamento de luz. A linha de base, **Ir**, corresponde ao espalhamento de luz antes da onda de DA atingir a região de observação. A seqüência do espalhamento é independente da direção de propagação da onda na retina, sendo o sinal composto por dois picos mínimos, **a** e **c**, e dois máximos, **b** e **d**. Em relação ao início da seqüência do espalhamento de luz, o pico **a** é atingido em poucos segundos e não aparece em alguns experimentos. O pico **c** ocorre na faixa de 1,5 a 3 min e o pico **d** de 3 a 8 min. Após a ocorrência do pico **d**, a intensidade de luz reduz-se lentamente e volta para o ponto de equilíbrio **Ir** em torno de 15 a 30 min.

Os valores absolutos das variações do espalhamento de luz durante a onda de DA foram relacionados à intensidade da linha de base **Ir** por MARTINS-FERREIRA e OLIVEIRA CASTRO (1966). Os autores verificaram que esses valores absolutos são diretamente proporcionais à intensidade **Ir**, indicando que o sinal óptico podia ser normalizado em relação à linha de base. A diferença na intensidade de luz entre os picos **b** e **c** é da ordem de 35% da intensidade da referência **Ir**.

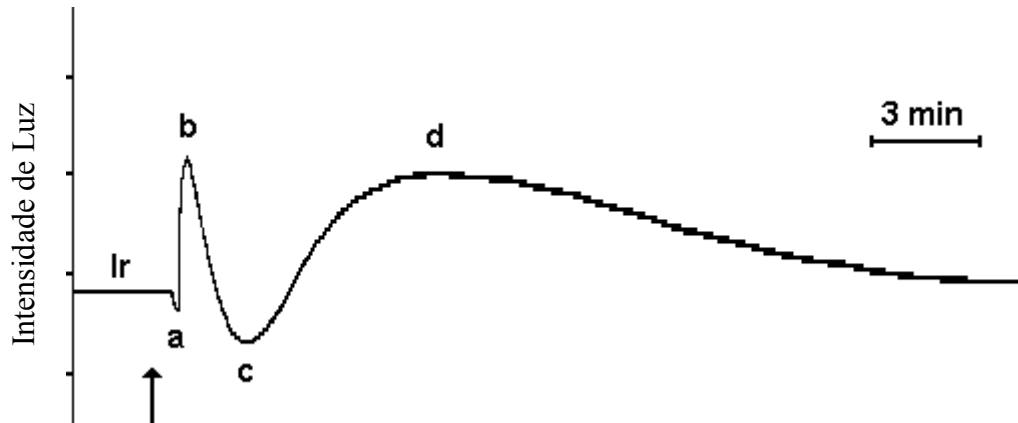


Figura II.7 - Morfologia padrão da seqüência do espalhamento de luz na retina mantida em solução nutriente. **Ir** é a intensidade do espalhamento de luz na ausência da onda de DA. O eixo das ordenadas está dividido em unidades arbitrárias e indica a intensidade de luz. A seta vertical indica o instante de aplicação do estímulo. (Adaptada de MARTINS-FERREIRA e OLIVEIRA CASTRO, 1966)

MARTINS-FERREIRA e OLIVEIRA CASTRO (1966) e MARTINS-FERREIRA (1983) concluíram que os picos **b** e **d** do sinal óptico possuem propriedades diferentes, e portanto, mecanismos distintos refletem sobre estes picos durante a onda de DA. Os autores conjecturaram que o pico **b** estaria relacionado com a forte movimentação iônica na frente de onda, enquanto o **d** relacionava-se com o metabolismo do tecido. OLIVEIRA CASTRO (1985) apontaram uma forte dependência entre os dois picos máximos do sinal óptico e o comprimento de onda da luz incidente. Os registros mostraram que a intensidade de luz retro-espalhada no pico **b** é maior para o comprimento de onda relativo à faixa do azul que na do vermelho. Por outro lado, a intensidade de luz retro-espalhada durante o pico **d** não apresenta diferença significativa para o comprimento de onda. Os resultados obtidos por esses pesquisadores estão reproduzidos na figura II.8. Observa-se, nesta figura, que ao variar o comprimento de onda da luz incidente, o pico **b** apresenta uma sensibilidade maior em relação do pico **d**.

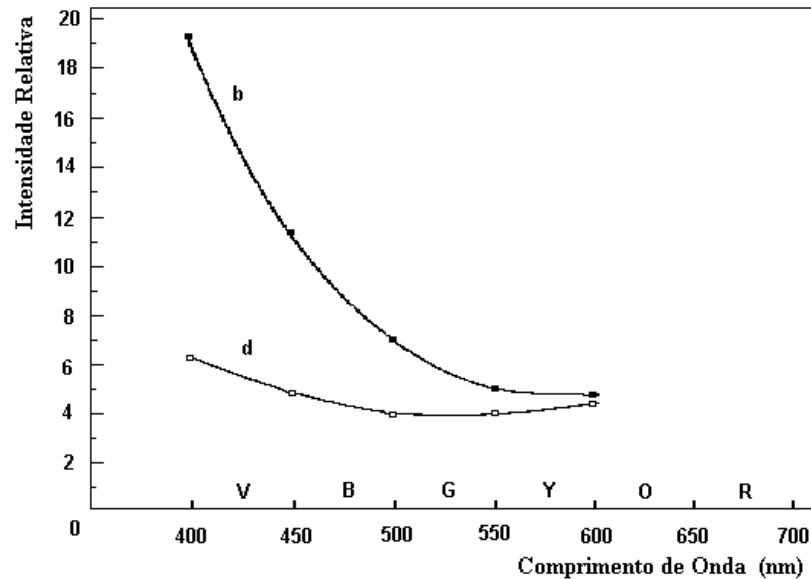


Figura II.8 - Intensidades relativas dos picos máximos **b** (●) e **d** (○) do sinal óptico e o comprimento de onda da luz incidente. Cada ponto corresponde à média de 10 medidas, onde, **V** - violeta; **B** - azul; **G** - verde; **Y** - amarelo; **O** - laranja; **R** - vermelho. (Adaptada de OLIVEIRA CASTRO, 1985)

II.3.1 - INFLUÊNCIA DA OSMOLARIDADE DO MEIO EXTRACELULAR SOBRE O ESPALHAMENTO DE LUZ NA RETINA DURANTE A ONDA DE DA

MARTINS-FERREIRA e OLIVEIRA CASTRO (1966) mostraram que alterações na osmolaridade do meio extracelular provocavam variações na transparência da retina e, conseqüentemente, mudanças no espalhamento de luz. Os dados experimentais indicaram que, em meio hipertônico, a intensidade da linha de base **Ir** aumenta e a retina torna-se mais opaca, reduzindo, dessa forma, a transmitância de luz. Por outro lado, ocorre o oposto na presença de um meio hipotônico. A intensidade **Ir** diminui e a retina se apresenta mais transparente, aumentando a transmitância de luz.

Nos experimentos, a concentração de NaCl presente na solução de imersão da retina foi alterada. Os resultados obtidos por Martins-Ferreira e seu grupo, referentes à variação na osmolaridade do meio extracelular, são mostrados no gráfico da figura II.9. Pode-se observar que, em soluções hipertônicas, o pico **a** do sinal óptico está sempre presente e que a intensidade do pico **b** pode, como ilustrado na figura II.9A₃, ser menor do que a intensidade da linha de base **Ir**. Entretanto, em soluções hipotônicas, o pico **a**

nunca aparece e a intensidade do pico **c** pode ser igual ou até mesmo ligeiramente maior que **Ir**, como indicado na figura II.9B₂. Durante a propagação da onda de DA, os pesquisadores verificaram que apesar da alteração do retro-espalhamento indicada pela linha de base, a diferença entre os valores dos picos **b** e **c** do sinal óptico permanecia praticamente a mesma, independente da osmolaridade do meio extracelular.

De acordo com MARTINS-FERREIRA e OLIVEIRA CASTRO (1966), as alterações ópticas da IPL durante a onda de DA estariam relacionadas com suas características morfológicas. As evidências experimentais, caracterizadas pelo movimento de água dentro do tecido durante a reação, foram indicadas em suas discussões, além de abordarem trabalhos que utilizaram outras estruturas neurais para estudo dessas movimentações.

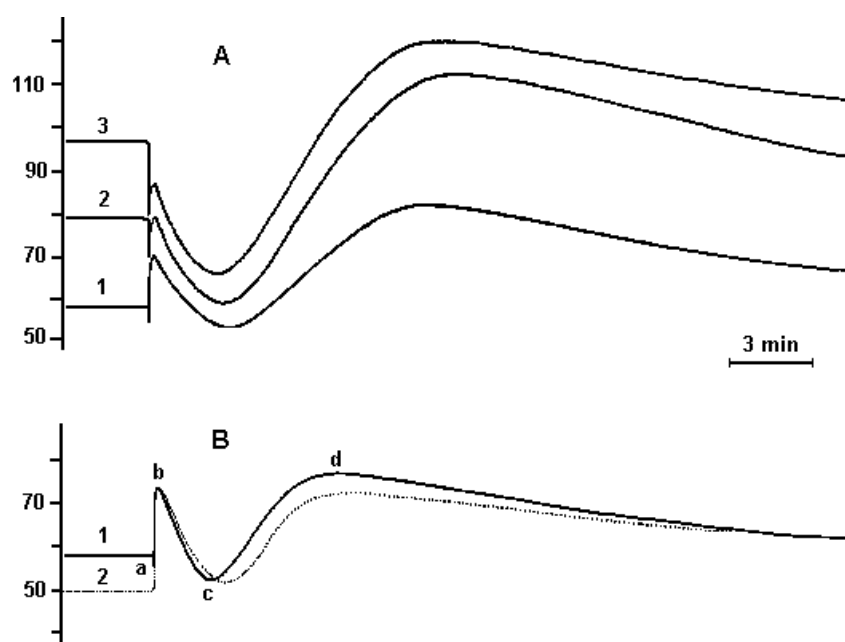


Figura II.9 - Efeito da variação da osmolaridade da solução nutriente sobre o sinal óptico durante a passagem da onda de DA. **A**: registro 1 foi obtido com uma fatia de retina presa em uma base escura, imersa em solução nutriente normal; registros 2 e 3 foram obtidos com o aumento progressivo na concentração de NaCl. **B**: registro 1, com solução nutriente normal e registro 2 obtido com uma solução com menor concentração de NaCl. O eixo das ordenadas, em A e B, está dividido em unidades arbitrárias de intensidade de luz, onde o zero corresponde à intensidade registrada na base escura. (Adaptada de MARTINS-FERREIRA e OLIVEIRA CASTRO, 1966)

II.3.2 - EFEITOS DA TEMPERATURA DA SOLUÇÃO DE IMERSÃO DA RETINA SOBRE O ESPALHAMENTO DE LUZ DURANTE A ONDA DE DA

Segundo MARTINS-FERREIRA e OLIVEIRA CASTRO (1966), estudos preliminares deste trabalho mostraram que variações da temperatura e a utilização de determinados agentes químicos também influenciavam o curso da seqüência do espalhamento de luz. Se retinas de ave fossem aquecidas a temperaturas dentro da faixa normal do corpo do animal, a duração da seqüência do espalhamento de luz era reduzida consideravelmente, como mostrado na figura II.10.2. Também foi observado que um aumento na concentração do íon potássio no meio extracelular foi capaz de reduzir a duração do sinal óptico e a amplitude do pico *d*, como indicado na figura II.10.3. Além disso, os autores verificaram que concentrações elevadas do íon K^+ causaram ciclos periódicos de DA.

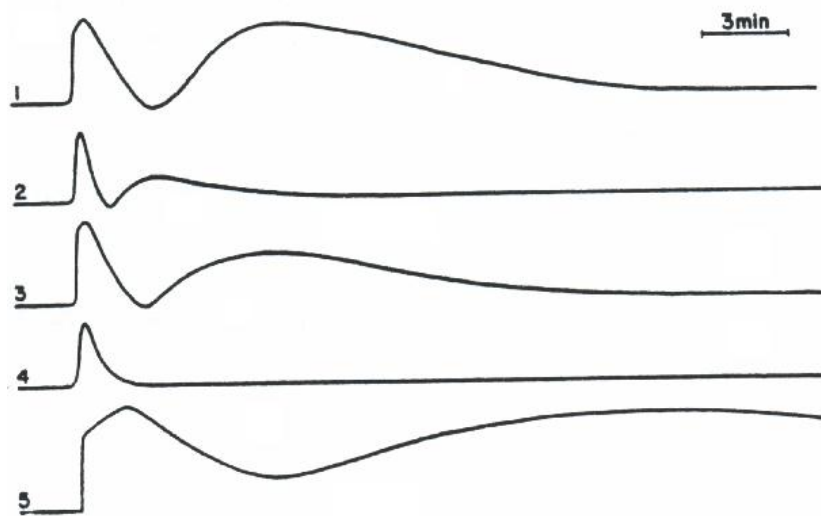


Figura II.10 - Registros de seqüências do espalhamento de luz obtidos a partir de retinas de ave sob diferentes condições. Registro 1: seqüência do espalhamento de luz em solução nutriente normal, a temperatura ambiente. Registro 2: seqüência do espalhamento de luz em solução nutriente normal, a 38 °C. Registro 3: seqüência do espalhamento de luz em solução nutriente contendo 6 mM de KCl. Registro 4: efeito de 0,9 mM de hidrocloreto de procaína. Registro 5: efeito de 0,4 mM de iodoacetato de sódio. (Adaptada de MARTINS-FERREIRA e OLIVEIRA CASTRO, 1966)

II.3.3 - CORRELAÇÃO ENTRE A ESPESSURA DA RETINA E O ESPALHAMENTO DE LUZ DURANTE A ONDA DE DA

OLIVEIRA CASTRO e MARTINS-FERREIRA (1970) estudaram variações do volume e da espessura da retina de ave durante a passagem da onda de DA e mostraram a concomitância dessas com a reação. Seus resultados experimentais indicaram que não existe uma correlação ponto a ponto entre o sinal óptico da onda e a curva de variação da espessura da retina. Os autores verificaram que alterações na geometria do tecido estavam relacionadas com a osmolaridade do meio extracelular, independente da presença da onda de DA, de modo que se a osmolaridade aumenta, a espessura da retina diminui e se a osmolaridade reduz, a espessura da retina aumenta. Segundo eles, as variações no espalhamento de luz e as alterações da geometria da retina seriam explicadas pelo fluxo de água entre os meios extra e intracelulares, que é responsável por mudanças estruturais no tecido.

II.4 - VELOCIDADE DE PROPAGAÇÃO DA ONDA DE DEPRESSÃO ALASTRANTE

A velocidade de propagação da onda de DA, cuja ordem é de poucos mm/min, é um parâmetro característico do fenômeno e seu estudo pode fornecer informações importantes dos mecanismos intrínsecos envolvidos na reação. Em 1963, a velocidade da onda foi medida em córtex de coelho, através do intervalo de tempo decorrido entre a passagem do potencial extracelular em eletrodos posicionados no tecido cortical (LEÃO, 1963). Esse procedimento permitiu mostrar a influência da concentração de NaCl na solução nutriente sobre a velocidade de propagação da onda. Foi verificado que a redução da concentração de NaCl aumentava a velocidade de propagação da reação em tecido cortical de coelho (LEÃO, 1963).

MARTINS-FERREIRA (1974) utilizaram uma técnica que permitia eliminar as prováveis interferências dos estímulos sobre as características do fenômeno através da onda de DA circulante que, uma vez iniciada, propagava-se por várias horas com velocidade constante. Os autores utilizaram um microfotômetro acoplado à ocular de um microscópio e mediram a velocidade de propagação da onda por meio do

intervalo de tempo decorrido entre ciclos consecutivos da onda de DA e da trajetória percorrida pela onda.

Uma outra técnica foi utilizada por MARTINS-FERREIRA (1983) para determinar a velocidade de propagação da reação. Segundo o autor, para se determinar a velocidade de propagação é necessário medir apenas a velocidade de propagação do sinal óptico. Já em 1993, este autor relata que as velocidades das ondas individuais estão entre 6 e 10 mm/min, enquanto que as ondas circulantes possuem velocidades de propagação de $3,71 \pm 0,21$ mm/min (MARTINS-FERREIRA, 1993). Para calcular a velocidade da onda individual, dois microeletrodos foram inseridos na IPL. A distância entre eles e o tempo necessário para a onda de DA percorrer essa distância forneceram o valor da velocidade de propagação.

A técnica proposta por DUARTE (2000) para estimar a velocidade da onda de DA consiste no desenvolvimento do perfil da frente de onda, que se baseia em uma combinação de janelas de amostragem da IPL extraídas de quadros consecutivos. Neste perfil, as janelas, cujas dimensões e posição espacial se mantêm, são justapostas em imagem única que resume as informações temporais e espaciais da propagação da onda em eixos distintos. O eixo x representa o deslocamento da frente de onda (Δs) e o eixo y representa o tempo decorrido neste deslocamento (Δt). Dessa forma, a velocidade pode ser obtida graficamente como $\Delta s/\Delta t$. A montagem proposta possibilitou o registro da velocidade da frente de onda e o resultado obtido, em sua condição experimental, foi de $4,85 \pm 0,81$ mm/min.

CAPÍTULO III - MATERIAIS E MÉTODOS

III.1 - PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

III.1.1 - SOLUÇÕES FISIOLÓGICAS

A solução nutriente utilizada para a preparação da retina e em alguns experimentos, baseada na solução descrita por MARTINS-FERREIRA e OLIVEIRA CASTRO (1966), foi denominada de Solução Normal (SN) e possui a seguinte composição em mM: NaCl 100,0, KCl 6,0, MgCl₂ 1,5, NaH₂PO₄ 1,0, NaHCO₃ 30,0, tris 10,0, glicose 20,0 e CaCl₂ 1,0. Para as demais soluções utilizadas nos experimentos com osmolaridade variável, as concentrações dos compostos foram baseadas na SN. Nas soluções hipotônicas utilizou-se NaCl nas concentrações de 60 e 80 mM. Para o caso das soluções hipertônicas, as concentrações de NaCl foram de 120 e 140 mM. As composições dos demais componentes das soluções foram mantidas constantes. Em todas as soluções o pH foi ajustado em 7,4 por adição de HCl.

III.1.2 - PREPARAÇÃO DA RETINA

Foram utilizadas retinas de ave () com idade entre 2 e 10 dias. Os animais foram acondicionados, conforme convenções internacionais, no biotério da UFSJ e não sofreram qualquer tipo de manipulação experimental até o dia de serem utilizados nos experimentos. Os animais foram sacrificados por decapitação. Com o uso de uma microtesoura, o olho foi removido da cabeça do animal, e por meio de um bisturi foi seccionado ao longo do equador. A retina pôde ser localizada no fundo do olho, coberta por . Com o uso de uma pinça de ponta fina, o foi retirado e o hemisfério inferior foi colocado em uma placa de Petri com SN, previamente aquecida a uma temperatura aproximada de 30 °C. Após vinte minutos de

repouso, a retina foi descolada do hemisfério inferior com o auxílio de uma pinça. Completamente isolada, a retina foi colocada sobre um cilindro preto de 2,5 mm de diâmetro, preso a uma base de ágar, e fixada por meio de microalfinetes (figura III.1), como descrito por DUARTE (2000). A base de ágar foi colocada dentro de uma cuba de 5 ml de volume e mantida em constante perfusão.

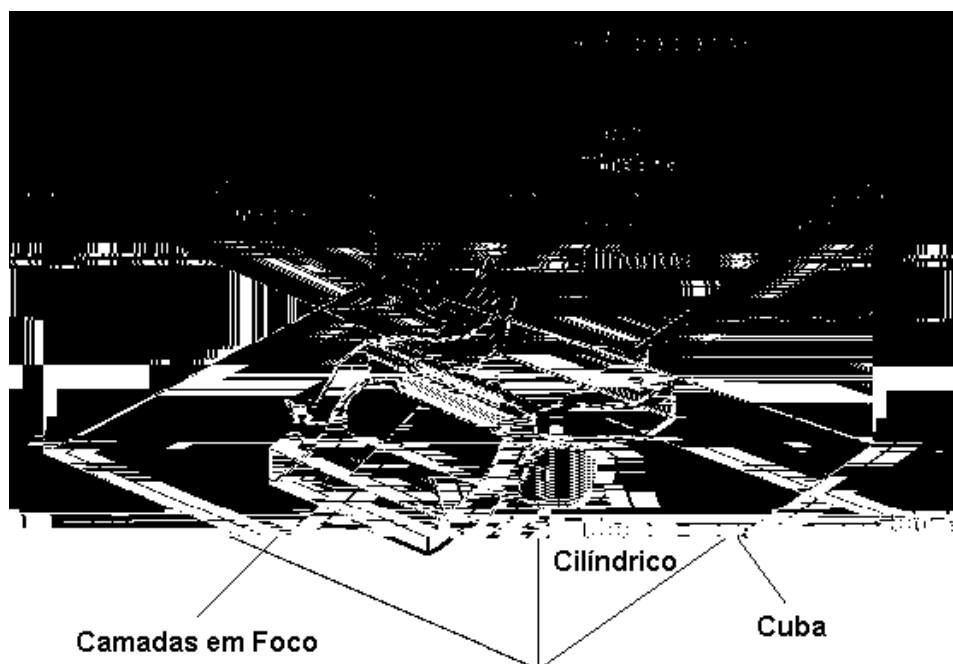


Figura III.1 - Disposição da retina sobre um cilindro preto fixado a uma base de ágar dentro de uma cuba de vidro. (Adaptada de DUARTE, 2000)

III.1.3 - PERFUSÃO

A perfusão das soluções nutrientes foi feita por meio de uma bomba peristáltica (Heidolph, PD5002, Alemanha) com uma taxa de 1,5 ml/min. As soluções utilizadas (normal, hipotônica ou hipertônica) foram pré-aquecidas em banho-maria a 40 °C. Monitorada por um termômetro digital, a temperatura da solução da cuba foi controlada por um sistema de aquecimento utilizando-se um elemento e ajustada em $29,2 \pm 0,2$ °C (média \pm DP).

Por inspeção visual, estimou-se que o equilíbrio osmótico foi atingido através do espalhamento de luz nas camadas da retina. O tempo necessário para que o

espalhamento de luz ficasse idêntico àquele nas condições de imersão em solução normal foi de aproximadamente 1,5 h, a partir do início da perfusão.

III.1.4 - ESTÍMULO

A reação de DA foi iniciada por estímulo mecânico ou elétrico, em intervalos regulares de 30 min entre cada onda de DA. A utilização deste intervalo de tempo entre ondas foi baseada no tempo médio da duração de uma onda individual, como descrito na literatura (MARTINS-FERREIRA e OLIVEIRA CASTRO, 1966).

O estímulo mecânico foi utilizado na maioria dos experimentos, através de uma micropipeta de ponta fina com diâmetro de aproximadamente 1,5 μm , que, controlada por um micromanipulador, perfurava a retina, dando início à reação. O posicionamento desta micropipeta foi ajustado no mesmo plano de incidência do feixe de , no lado oposto ao posicionamento do eletrodo de registro do potencial, a uma distância de 5 a 7 mm aproximadamente entre eles.

O estímulo elétrico foi feito através de uma onda quadrada, simétrica, de amplitude, frequência e duração controladas. Os valores ótimos de estímulo foram os de amplitude de 8 V e frequência de 10 Hz. O estímulo foi aplicado por meio de um par de eletrodos de prata-cloreto de prata (Ag-AgCl) inserido em um capilar de vidro, do tipo teta, com 1,5 mm de diâmetro (Clark Electromedical Instruments, TST150-6, EUA). O capilar foi preenchido com SN. Este estímulo foi aplicado por um Sistema Auxiliar de Experimentos (SAE) através de um gerador de sinais implementado em computador (SILVA, 2000). A extremidade do capilar foi posicionada no mesmo plano do feixe de incidente, em uma região oposta àquela do eletrodo de registro, a uma distância de 7 mm.

III.1.5 - DESCRIÇÃO DA MONTAGEM EXPERIMENTAL

A figura III.2 representa o diagrama esquemático da montagem experimental como descrito por DUARTE (2000). Esta técnica foi utilizada em todos os experimentos. Com esta montagem, foi possível estudar o espalhamento de luz na retina iluminada com feixe de . Os sinais óptico e elétrico obtidos foram registrados em fita de vídeo e em computador, para processamento e análise posteriores. A figura III.3 mostra um diagrama estrutural da montagem onde podem ser vistos uma base anti-vibração; o posicionamento dos eletrodos de registro e estímulo, internos à gaiola de Faraday; e a cuba sobre uma mesa XY.

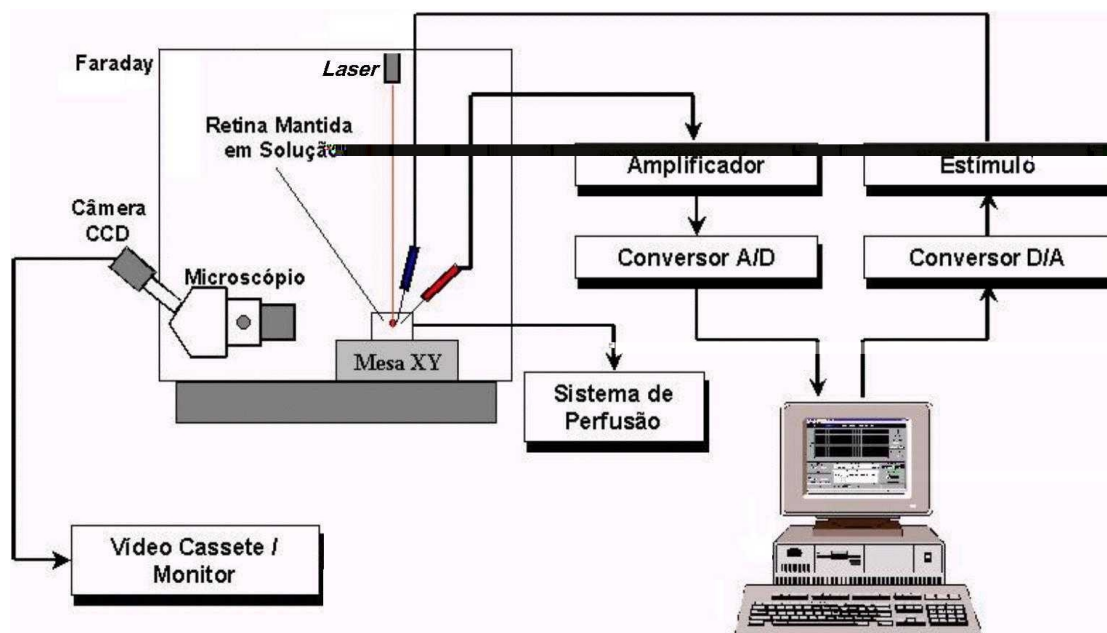


Figura III.2 - Diagrama da montagem experimental utilizada nos experimentos com retina de ave com fontes de . (Adaptada de DUARTE, 2000)

A mesa anti-vibração foi construída com bases de cimento (figura III.3) com as seguintes dimensões: 120 x 80 x 60 cm para a base fixa e 120 x 80 x 24 cm para a base móvel. Câmaras de ar foram colocadas entre as bases fixa e móvel.

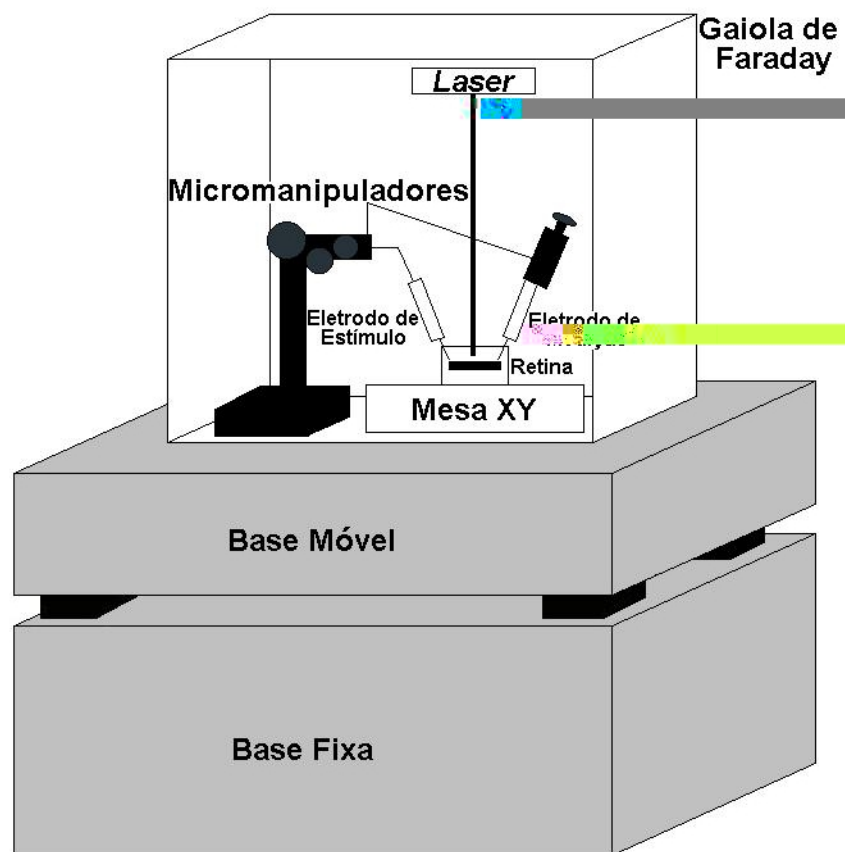


Figura III.3 - Diagrama estrutural da montagem utilizada nos experimentos com retina de ave com fontes de

Foram utilizadas as seguintes fontes de : uma de He-Ne, 2 mW (Xerox, 05-LHR-551, EUA), com comprimento de onda de 632,8 nm (faixa do vermelho) e outra de He-Ne, 5 mW (Coherent, 31-2772-000, EUA), com comprimento de onda de 543,5 nm (faixa do verde). Os feixes de incidiram sobre o eixo óptico de uma lente objetiva 5x/0,12/ ∞ (Zeiss, Zeiss Achrostigmat, Alemanha), e, em seguida, sobre a superfície de uma lente cilíndrica de 6 mm de diâmetro. Desta forma, feixes divergentes resultantes, restritos a um setor angular, como detalhado na figura III.1, possibilitaram a visualização das camadas da retina sem qualquer corte histológico.

Uma binocular acoplada a uma câmera CCD (Kocom Ltda, KCC310ND, Japão) foi utilizada para captação do espalhamento de luz proveniente das camadas da retina. Uma binocular de baixa ampliação (Askania, GSZ 2T, Alemanha) foi posicionada de modo que sua objetiva apresentasse um ângulo de 180° em relação à mesa XY. Desta forma, foi possível captar a luz espalhada vinda da iluminação com em um plano

perpendicular ao eixo da objetiva. A câmera digital CCD, com saída em VHS, resolução de 450 linhas horizontais para TV e acoplamento direto ao microscópio, permitiu a detecção do espalhamento de luz proveniente das camadas da retina. Os sinais ópticos obtidos foram gravados em vídeo cassete (Zenith, VR4236HF, Rio de Janeiro) e posteriormente digitalizados. Os registros do espalhamento de luz durante a propagação de uma onda de DA foram feitos no sistema NTSC, com o tempo de gravação de 25 a 30 min e as imagens extraídas em RGB, com uma taxa de amostragem em torno de 2 quadros/s.

Para o registro do potencial extracelular, resultante da propagação da onda de DA, foi utilizado um eletrodo de Ag-AgCl inserido em uma micropipeta com ponta de 1,5 μm de diâmetro. A micropipeta utilizada foi estendida através de um estirador de pipetas universal (Zeitz-Instruments, DMZ-Universal Puller, Alemanha), por meio do programa P09, pré-gravado pelo fabricante, sem polimento na ponta. As micropipetas foram estendidas a partir de um tubo capilar (Clark Electromedical Instruments, 1B150F-4, EUA) e preenchidas com solução de NaCl 1,0 M. O microeletrodo foi acoplado a um amplificador que foi ligado a uma interface AD (Axon Instruments, Digidata 1200, EUA) e a um microcomputador pessoal com processador Pentium IV (Intel, EUA), para aquisição do sinal elétrico.

Um pré-amplificador diferencial, de ganho 10 e fabricação própria, foi acoplado ao micromanipulador de controle de posição do eletrodo de registro. O sinal deste pré-amplificador foi enviado a um amplificador de baixo ruído (ISO-DAM, WPI, EUA), com ganho ajustado em 10, com a frequência de corte do filtro passa-baixa ajustada em DC e a do filtro passa-alta ajustada em 200 Hz. Através do sistema SAE, o sinal do amplificador foi amostrado a 50 Hz.

III.2 - MÉTODOS COMPUTACIONAIS

Os procedimentos computacionais utilizados para a determinação das alterações sobre os parâmetros cinéticos da onda de DA, quando da variação da concentração de NaCl, foram constituídos pelas etapas computacionais descritas nos itens subseqüentes.

III.2.1 - DIGITALIZAÇÃO DE IMAGENS

A aquisição do sinal óptico foi feita com o aplicativo Vidcap[®] 1.1 (Microsoft, EUA) a partir de imagens gravadas em vídeo cassete. Esse aplicativo permite transformar imagens de vídeo em arquivos de animação no formato *.avi (extensão normalmente utilizada para vídeos digitalizados). A taxa de amostragem para uma animação é estabelecida em função da velocidade de processamento do computador utilizado e do formato das imagens digitalizadas. A taxa média de amostragem da animação foi de 2 quadros/s e o formato utilizado foi RGB (, e). Essa foi a maior taxa possível sem descontinuidade dos quadros digitalizados. Uma imagem RGB é representada por uma matriz que contém 3 planos. O primeiro plano corresponde à cor vermelha, o segundo à verde e o terceiro à azul.

Após a criação de um arquivo de animação utilizou-se o aplicativo Videdit[®] 1.1 (Microsoft, EUA) para a obtenção de quadros individuais de interesse. Esse aplicativo fornece quadros digitalizados no formato *.dib.

Para melhorar o desempenho computacional, os quadros extraídos no formato *.dib foram compactados e convertidos em outros no formato *.jpg. Para essa conversão utilizou-se o programa chamado Gwspro (Graphic Workshop[™] Professional 2.0a, Alchemy Mindworks, EUA).

III.2.2 - PROCESSAMENTO DE IMAGEM

De cada onda de DA, extrai-se um conjunto de imagens digitalizadas com intervalos regulares. A técnica utilizada para processamento de imagem (DUARTE , 2003) permite a determinação da velocidade da frente de onda e a construção da ETEL (Evolução Temporal e Espacial do Espalhamento de Luz). Segundo esses autores, a longa duração de um evento de DA (em torno de 15 min) justifica a

construção de uma imagem única capaz de condensar as informações sobre as alterações no espalhamento de luz durante a DA.

Segundo GONZALEZ e WOODS (1993), para se determinar a intensidade de luz de um determinado a partir do formato RGB, deve-se utilizar uma matriz de transformação linear para o sistema HSI (, e), que é uma matriz diagonal 3X3 cujos elementos têm valores iguais a 1/3. Desta forma, a intensidade de luz total de um de posição (i, j) é obtida, a partir da intensidade de luz de cada plano do sistema RGB, através da aplicação da equação III.1 (GONZALEZ e WOODS, 1993).

$$I(i, j) = \frac{1}{3} [I_R(i, j, 1) + I_G(i, j, 2) + I_B(i, j, 3)], \quad \text{III.1}$$

onde **I** é a intensidade de luz total do localizado na posição (i, j), **I_R** é a intensidade de luz correspondente ao plano vermelho, **I_G** é a correspondente ao plano verde e **I_B** ao plano azul.

III.2.3 - ESTIMATIVA DA VELOCIDADE DA FRENTE DE ONDA DE DA

Para estimar a velocidade da frente de onda, janelas de amostragem da IPL de quadros consecutivos foram justapostas. Segundo DUARTE (2000), a imagem resultante desta justaposição, denominada Perfil da Frente de Onda (PFO), resume as informações temporais e espaciais da propagação da frente de onda em eixos distintos. A figura III.4 apresenta esta técnica onde o eixo x representa o deslocamento da frente de onda e o eixo y representa o tempo decorrido neste deslocamento. A velocidade **v** da frente de onda é determinada pela inclinação da reta tangente, dada pelo ângulo **θ**.

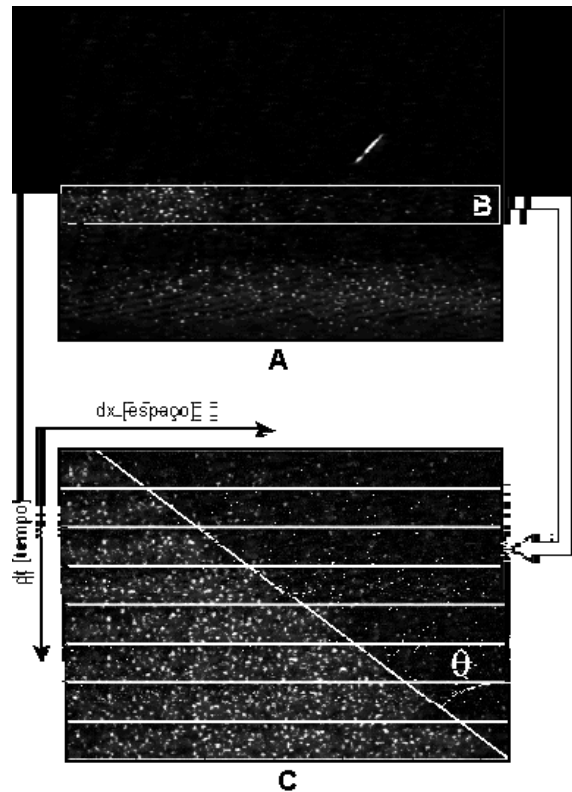


Figura III.4 - Diagrama do procedimento utilizado para determinação da velocidade da frente de onda. **A:** Imagem digitalizada da retina iluminada com na faixa do vermelho. **B:** Janela de amostragem da IPL. **C:** Imagem única dos quadros sucessivos com intervalos de tempo regulares. (Adaptada de DUARTE 2003)

III.2.4 - CONSTRUÇÃO DA ETEL

A construção da Evolução Temporal e Espacial do Espalhamento de Luz (ETEL), nas camadas da retina durante a onda de DA, foi feita por um programa desenvolvido em Matlab 5.3 (The Mathworks, Natick) por DUARTE (2003).

Uma janela de amostragem é determinada por uma matriz de M linhas por N colunas, definindo a região de interesse dos quadros sucessivos extraídos do vídeo digitalizado. A figura III.5 mostra esse procedimento para um quadro digitalizado e a janela de amostragem definindo todas as camadas da retina como as de interesse.

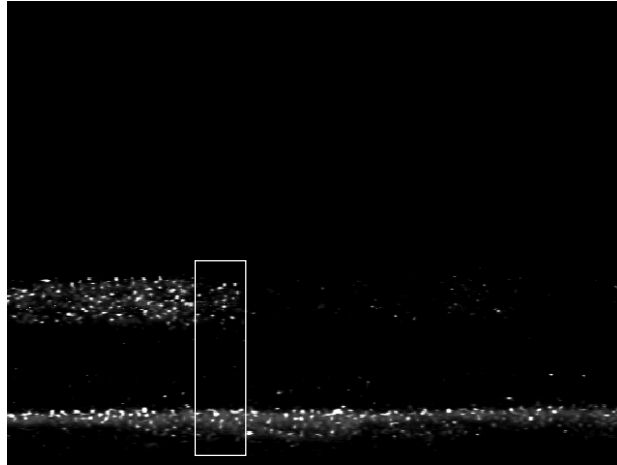


Figura III.5 - Janela de amostragem definindo uma região de interesse na retina de ave.

Durante o intervalo de tempo entre dois quadros sucessivos, a frente de onda avança sobre n colunas. O valor de n é calculado como mostra a equação III.2.

$$n = \frac{v}{\tau_a}, \quad \text{III.2}$$

onde v é a velocidade de propagação, em pixels/s, e τ_a é a taxa de amostragem, em quadros/s.

O número de colunas N da janela de amostragem foi determinado como sendo um número ímpar, inferior àquele obtido pela equação III.2, para que não houvesse superposição de informação da intensidade de luz entre dois quadros sucessivos.

Ao se determinar o número de colunas percorridas pela frente de onda entre quadros sucessivos, obtém-se o número de quadros NQ onde a informação óptica, interna à janela de amostragem, e considerada semelhante durante a propagação, permanece no campo de visão definido por 640 colunas. A partir de uma imagem inicial, como pode ser visto na figura III.6, a mesma informação do espalhamento de luz é amostrada nos NQ quadros sucessivos e uma janela resultante é obtida pela média das janelas. Repetindo-se este procedimento para o quadro subsequente ao inicial, obtém-se uma segunda janela que é justaposta à anterior e assim sucessivamente. O conjunto das janelas justapostas define uma imagem resultante que DUARTE (2003) denominaram de ETEL. Esta imagem resume a evolução temporal e espacial do

espalhamento de luz nas camadas da retina, durante a onda de DA, em uma única imagem.

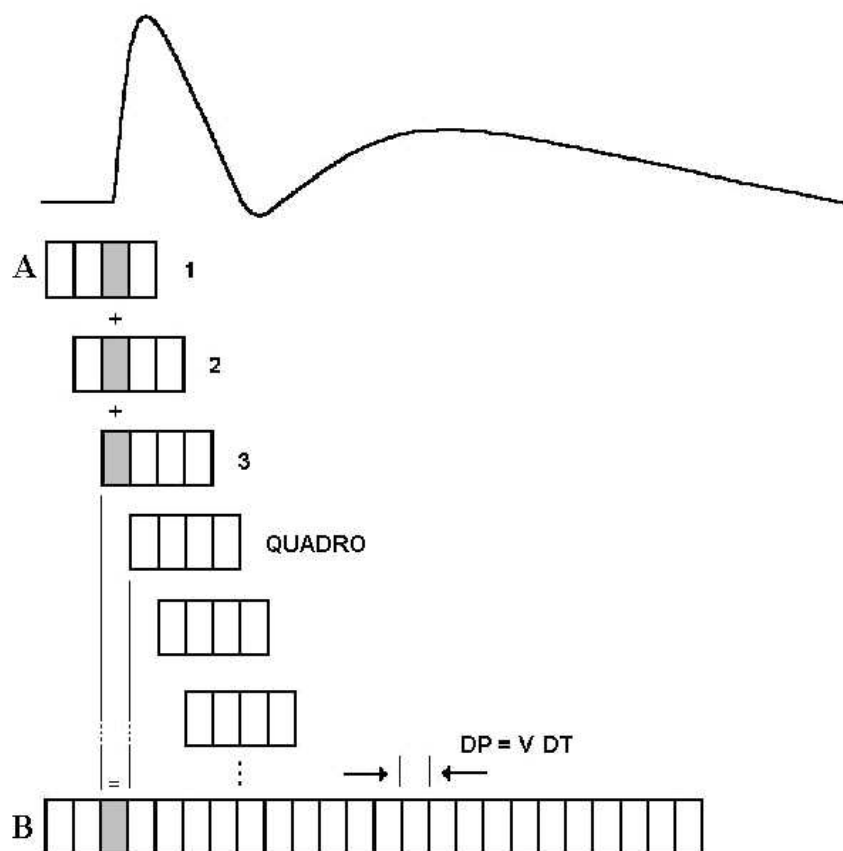


Figura III.6 - Diagrama esquemático do procedimento utilizado para determinar a imagem do espalhamento de luz nas camadas da retina, onde V é a velocidade de propagação da frente de onda; DT o intervalo de amostragem; DP o número de colunas atingidas pela frente de onda entre dois quadros. **A**: Baseado em um conjunto de quadros seqüenciais (1, 2 e 3), um grupo de janelas que corresponde à mesma fração do sinal óptico é determinado. **B**: Espalhamento de luz nas camadas da retina resultante da média das janelas. (Adaptada de DUARTE, 2003)

III.2.5 - SEQÜÊNCIA DO SINAL ÓPTICO EM FUNÇÃO DO TEMPO

A partir da imagem da ETEL da onda de DA, a seqüência do sinal óptico em função do tempo pode ser representada em um sistema de eixos cartesianos. Para tal, uma janela de amostragem é determinada para uma camada de interesse, como mostrado na figura III.7A. Neste caso, a janela corresponde a uma matriz de x linhas por

y colunas, onde x define a IPL como a de interesse e y o número de colunas total da ETEL convertidas para a unidade de tempo. Um vetor linha resultante, de y colunas, é obtido como o valor médio da intensidade de luz das x linhas da janela de amostragem. Esse vetor forma a seqüência temporal do sinal óptico em um sistema de eixos, como mostrado na figura III.7B.

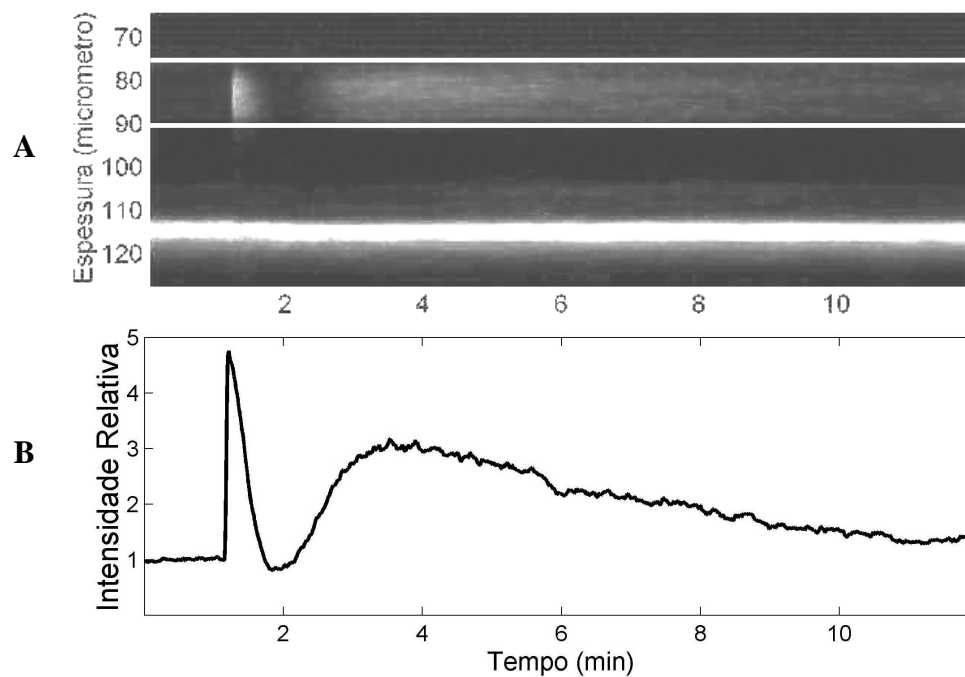


Figura III.7 - **A**: Janela de amostragem da IPL. **B**: Seqüência temporal do sinal óptico representada pela média de cada linha da janela de amostragem.

III.2.6 - EFEITO DA OSMOLARIDADE SOBRE O SINAL ÓPTICO INTRÍNSECO

A análise das alterações sobre a intensidade dos picos característicos do sinal óptico, em função da variação da concentração de NaCl e do comprimento de onda da luz incidente, foi feita a partir da evolução temporal da onda de DA.

Os valores dos picos máximos **b** e **d** foram extraídos do PFO obtido para cada comprimento de onda da luz incidente (vermelho e verde) e a razão entre eles foi feita, conforme determinado nas equações III.3 a III.5.

$$\text{Pico b} = \frac{b - \bar{I_r}}{\bar{I_r}}, \quad \text{III.3}$$

$$\text{Pico d} = \frac{d - \bar{I_r}}{\bar{I_r}}, \quad \text{III.4}$$

$$\frac{b}{d} = \frac{\text{Pico b}}{\text{Pico d}}, \quad \text{III.5}$$

onde **b** e **d** são os picos máximos do sinal óptico, como visto na figura III.8, e $\bar{I_r}$ corresponde à intensidade média do espalhamento de luz antes da onda de DA.

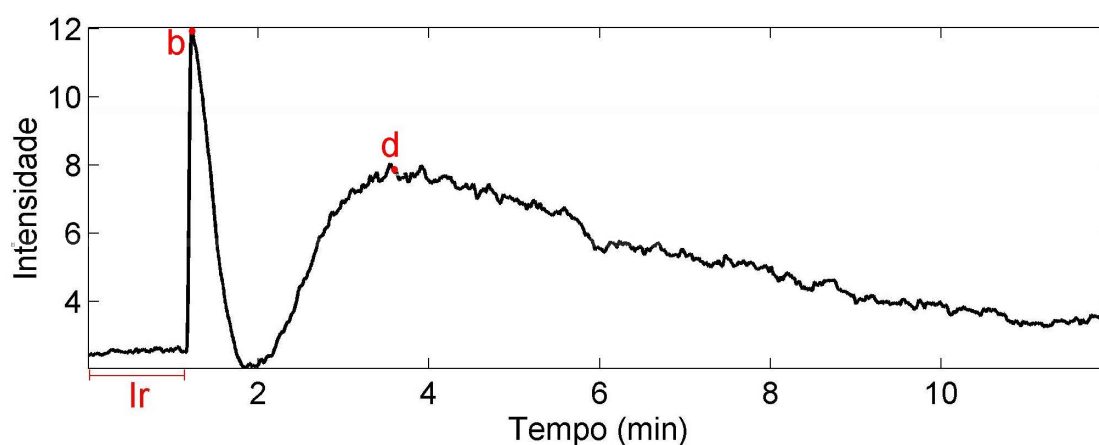


Figura III.8 - Evolução temporal do espalhamento de luz na IPL. **I_r** é a linha de base correspondente à intensidade relativa de luz espalhada antes da reação, **b** e **d** são os picos máximos do sinal.

III.2.7 - COMPRIMENTO LONGITUDINAL DA FRENTE DE ONDA

O estudo sobre a dependência dos parâmetros espaciais do sinal óptico em função da variação da concentração de NaCl foi feito como descrito a seguir. O comprimento da frente de onda foi determinado a partir da transformação da seqüência temporal em outra espacial do espalhamento de luz. O vetor representativo do espaço foi calculado através do produto da velocidade de propagação da onda de DA pelo vetor tempo referente àquele evento. A seqüência resultante foi representada num sistema de eixos cartesianos, como mostrado na figura III.9.

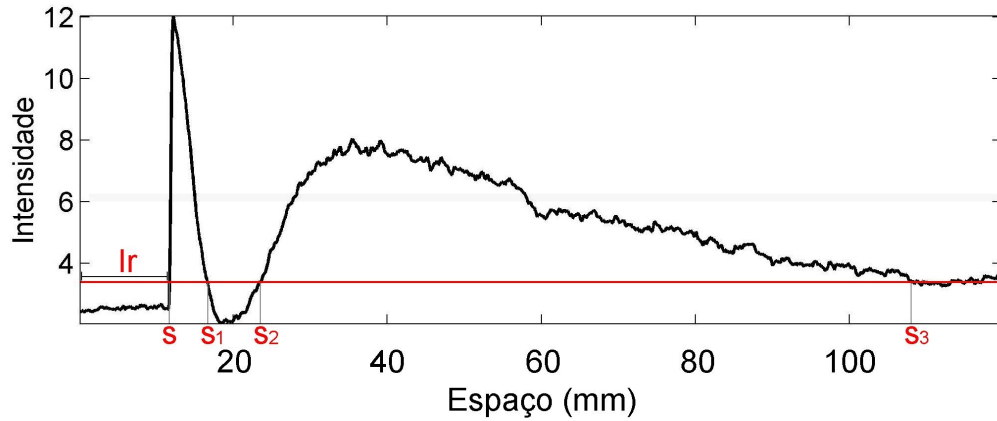


Figura III.9 - Seqüência espacial do espalhamento de luz. \bar{I}_r é a intensidade relativa de luz antes da onda DA, s , s_1 , s_2 e s_3 correspondem às posições espaciais que interceptam a linha de referência (paralela ao eixo horizontal) definida como $s = \bar{I}_r + \frac{3 DP}{\sqrt{n}}$ (99% de confiança).

Para determinar o início da onda de DA, foi necessário definir uma referência s , fornecida pela equação III.6, com 99% de confiança.

$$s = \bar{I}_r + \frac{3 DP}{\sqrt{n}}, \quad \text{III.6}$$

onde s é a posição do início da onda de DA, \bar{I}_r é a média da linha de base, DP é o desvio padrão e n é o número de pontos correspondentes à linha de base.

A reta paralela ao eixo horizontal, representada na figura III.9, corresponde à intensidade de luz espalhada referente à posição s . Os pontos de intercepção da curva do espalhamento de luz com a linha de referência, s_1 , s_2 e s_3 , foram extraídos da seqüência do espalhamento de luz, e, a partir deles, os comprimentos dos picos b , c e d do sinal óptico foram determinados conforme as equações III.7 a III.9.

$$s_b = s_1 - s, \quad \text{III.7}$$

$$s_c = s_2 - s_1, \quad \text{III.8}$$

$$s_d = s_3 - s_2, \quad \text{III.9}$$

onde s_b , s_c e s_d são os comprimentos dos picos b , c e d do sinal óptico, respectivamente.

III.2.8 - POTENCIAL EXTRACELULAR

Ao final de cada experimento, o microeletrodo de registro do potencial extracelular foi recuado da posição inicial. A retina foi removida do campo em foco e o microeletrodo foi reposicionado de acordo com a escala do micromanipulador.

A imagem da ponta da micropipeta foi gravada em vídeo cassete através da câmera CCD (figura III.10). Esse procedimento foi repetido pelo menos 10 vezes com o objetivo de reduzir o erro. As imagens do reposicionamento do microeletrodo foram digitalizadas. Utilizando o aplicativo PhotoEditor[®] 3.0 (Microsoft, EUA), um par ordenado (**linha**, **coluna**) representativo da posição da ponta do eletrodo foi determinado.

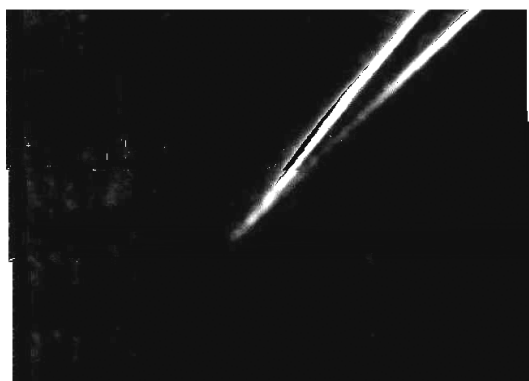


Figura III.10 - Imagem digitalizada da ponta da micropipeta utilizada para registro do potencial extracelular.

Para salientar a identificação do posicionamento da ponta da micropipeta dentro da retina, imagens foram gravadas sem a remoção da retina, como mostrado na figura III.11. A posição da ponta foi estimada pela equação III.10.

$$S_p = \frac{S}{E}, \quad \text{III.10}$$

onde **S_p** corresponde à posição do microeletrodo em relação à IPL; **S** à posição da ponta do microeletrodo, em e **E** à espessura da IPL, em .

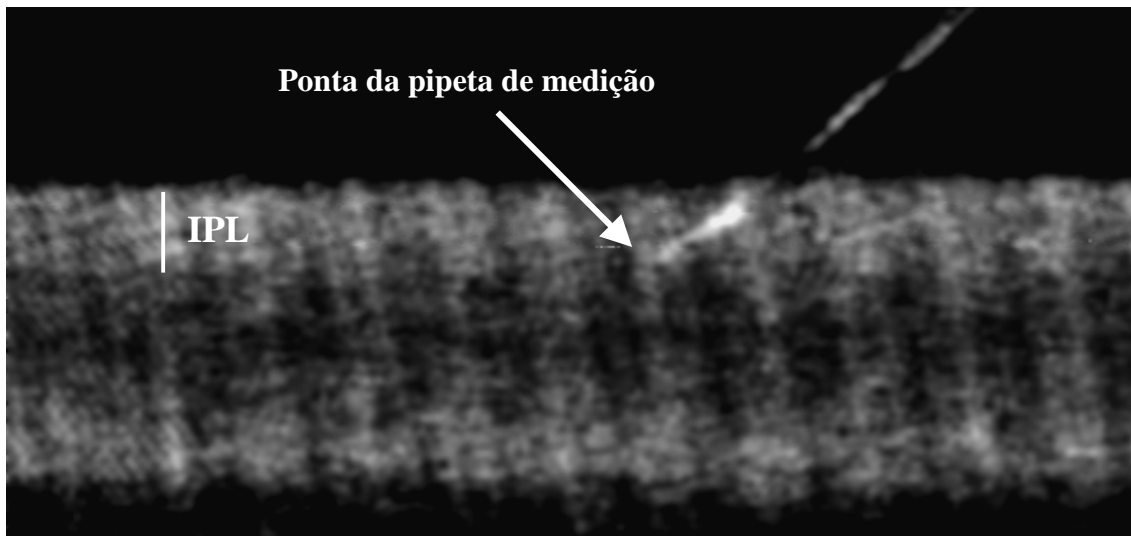


Figura III.11 - Imagem digitalizada da retina de ave. A barra vertical representa a espessura da IPL e a seta indica a ponta da micropipeta dentro da retina.

Uma vez determinada a posição do microeletrodo na retina, as variações da amplitude do pico do potencial extracelular foram medidas e processadas em função dessa posição e da variação da concentração de NaCl no meio extracelular. A amplitude desse potencial foi determinada considerando a diferença entre o seu valor mínimo e o valor médio da linha de base.

Além do estudo das alterações dos picos do sinal óptico, o comprimento longitudinal do potencial extracelular também foi analisado em função da alteração da concentração de NaCl na solução de imersão. A largura do potencial foi determinada de forma similar ao comprimento da frente de onda de DA, por meio de uma transformação da seqüência temporal em outra espacial. O vetor representativo do espaço foi determinado a partir do produto da velocidade de propagação da onda de DA pelo vetor tempo referente àquele evento. Representou-se a seqüência resultante num sistema de eixos cartesianos, como ilustrado na figura III.12. Nesta figura, **R** corresponde ao valor médio da linha de base antes do início do potencial.

Para determinar o início e o final da dinâmica do potencial, definiram-se os pontos inicial s_0 e o final s_1 . A distância entre esses dois pontos será o comprimento longitudinal do potencial identificado como s_p . Os cálculos para s_0 e s_p foram feitos

através das equações III.11 e III.12. O ponto de referência s_0 foi determinado como sendo o valor médio da linha de base menos o valor do correspondente desvio padrão, como explicitado na equação III.11. Uma reta paralela ao eixo espacial foi traçada passando por este ponto. O cruzamento desta reta com a curva de potencial, após o pico, definiu o ponto s_1 . Assim, o comprimento longitudinal pôde ser calculado através da equação III.12.

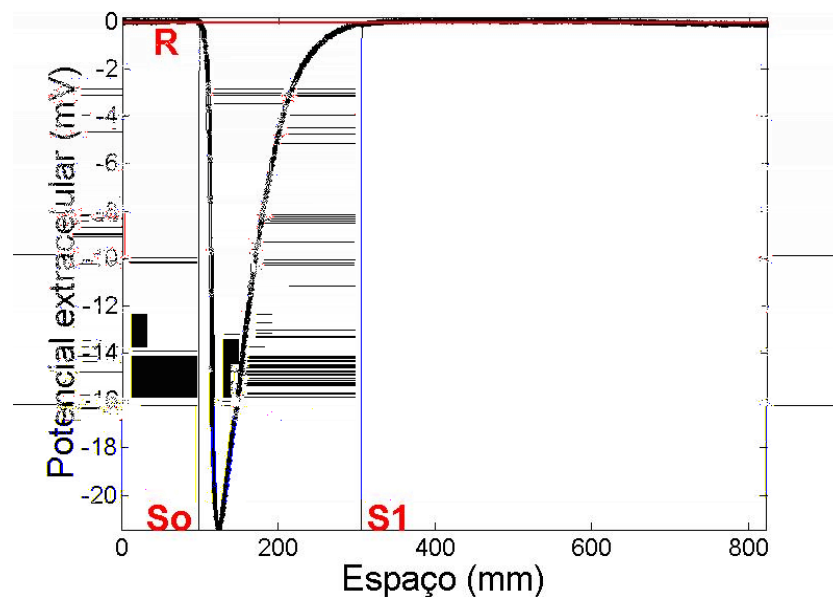


Figura III.12 - Seqüência espacial do potencial extracelular. **R** corresponde à linha de base do potencial DC, s_0 e s_1 correspondem às posições espaciais que interceptam a linha de referência (paralela ao eixo horizontal) definida como $s_0 = \bar{R} - DP$.

$$s_0 = \bar{R} - DP \quad \text{III.11}$$

$$s_p = s_1 - s_0, \quad \text{III.12}$$

onde s_0 é a posição do início do potencial, s_1 é a posição que determina o término do potencial, \bar{R} é a média da linha de base, **DP** é o desvio padrão e s_p é o comprimento longitudinal do potencial extracelular.

III.2.9 - ESPESSURA DA CAMADA PLEXIFORME INTERNA

Para cada retina utilizada, a espessura da IPL foi definida a partir de um quadro de referência, por meio do programa PhotoEditor. Um exemplo desse quadro está representado na figura III.11, onde as linhas correspondentes à camada da IPL estão indicadas por uma barra vertical. A estimativa da espessura foi feita por Tpr(f)4(p)-g(o)sura

CAPÍTULO IV - RESULTADOS EXPERIMENTAIS

IV.1 - ESPALHAMENTO DE LUZ NAS CAMADAS DA RETINA DURANTE A ONDA DE DA

As alterações no espalhamento de luz decorrentes da passagem da frente de onda de DA com a retina de ave imersa em meios de diferentes concentrações de NaCl foram analisadas através da utilização da técnica de construção da ETEL. Uma imagem digitalizada da frente de onda propagando na retina iluminada com feixe de e em solução normal está representada na figura IV.1. Essa figura mostra o espalhamento de luz, em um determinado instante de tempo, ao longo de todas as camadas da retina. Verifica-se que o aumento no espalhamento, decorrente da passagem da onda, é majoritário na IPL em comparação com as outras camadas do tecido. Nesse caso, a onda de DA propaga-se da esquerda para a direita e a IPL está identificada pela barra vertical. A onda de DA ilustrada nessa figura foi deflagrada por meio de estímulo mecânico e sua velocidade foi determinada utilizando-se o método descrito em DUARTE (2000). A velocidade dessa onda é 2,42 mm/min.

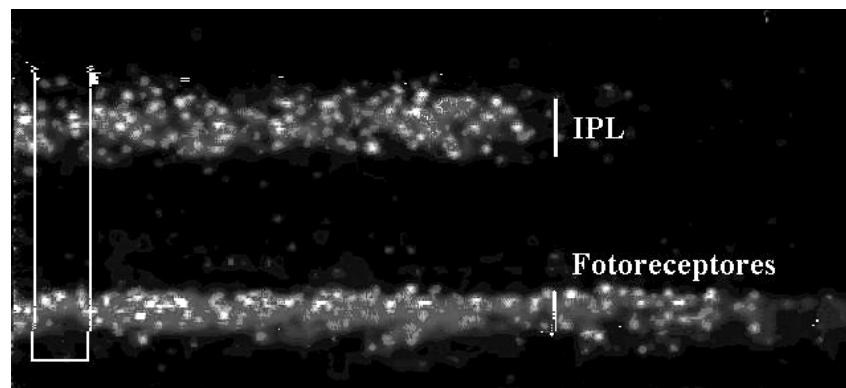


Figura IV.1 - Onda de DA propagando-se da esquerda para a direita em retina de ave imersa em solução de composição normal. Observa-se que praticamente todo o sinal óptico se encontra concentrado ao longo da IPL.

Uma janela de amostragem foi determinada por uma matriz de 267 linhas e 13 colunas, como mostrado na figura IV.1, definindo as camadas de interesse para a construção da ETEL (número de linhas) e a região de mesma informação óptica, no campo de visão, nos quadros sucessivos (número de colunas). O número de colunas da

janela de amostragem foi determinado através do valor da velocidade de propagação da onda (2,42 mm/min), da taxa de amostragem das imagens (2,6 quadros/s) e pela equação III.2. A aplicação dessa equação também informa o espaço percorrido pela onda de DA entre quadros sucessivos. Ao se determinar o número de colunas da janela de amostragem fica definido o número de quadros, NQ, onde a informação óptica permanece no campo de visão limitado a 640 colunas. Nesse caso, NQ é igual a 49. A partir de uma imagem inicial, a informação do espalhamento de luz dessa janela foi amostrada em 49 quadros sucessivamente deslocados de 13 colunas. A média dessas 49 informações formou a primeira janela da ETEL. Repetiu-se esse procedimento para o quadro subsequente ao inicial, obtendo-se uma segunda janela que foi justaposta à anterior e assim sucessivamente. Construída dessa forma, a ETEL dessa onda de DA está apresentada na parte superior da figura IV.2.

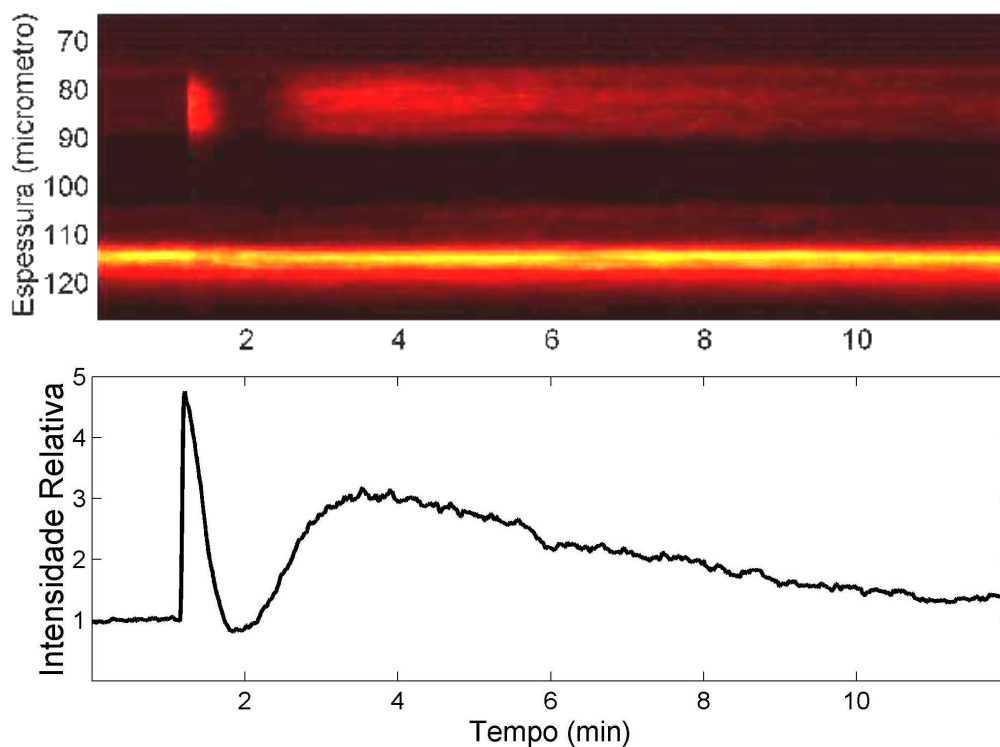


Figura IV.2 - Imagem do espalhamento de luz nas camadas da retina imersa em solução nutriente de composição normal representando a evolução espacial e temporal da onda de DA em retina de ave deflagrada por estímulo mecânico.

A evolução temporal do espalhamento de luz foi obtida a partir da imagem resultante da ETEL. Considerando-se apenas a região relativa IPL, pode-se observar, em

eixos cartesianos XY, a variação temporal da luz espalhada durante a passagem da onda de DA. A reconstrução da intensidade do espalhamento na escala temporal foi feita determinando-se a média das linhas correspondentes à camada de interesse. Para a onda de DA ilustrada na parte superior da figura IV.2, as variações na intensidade do sinal óptico correspondente à IPL estão apresentadas na parte inferior desta figura.

MARTINS-FERREIRA e OLIVEIRA CASTRO (1966) mostraram que o sinal óptico apresenta alterações em sua seqüência temporal, em condições de osmolaridade variável, antes do equilíbrio osmótico ser atingido. A figura IV.3 ilustra registros feitos do espalhamento de luz em retina de ave em função da variação da osmolaridade da solução nutriente, após o equilíbrio osmótico ter sido atingido. Na parte superior da figura IV.3, são apresentadas as ETEL dos sinais ópticos em condições hiper e hipotônicas onde está salientado apenas o espalhamento de luz na IPL. Na coluna **A** desta figura, o registro refere-se a uma condição hipotônica com concentração de NaCl de 60 mM e em **B** foi utilizada solução hipertônica com concentração de NaCl de 140 mM. A evolução temporal do espalhamento de luz referente à IPL está apresentada na parte inferior da figura IV.3. Os registros permitem observar que a intensidade do pico **b**, em meio hipertônico, é reduzida, contrário ao que ocorre em meio hipotônico.

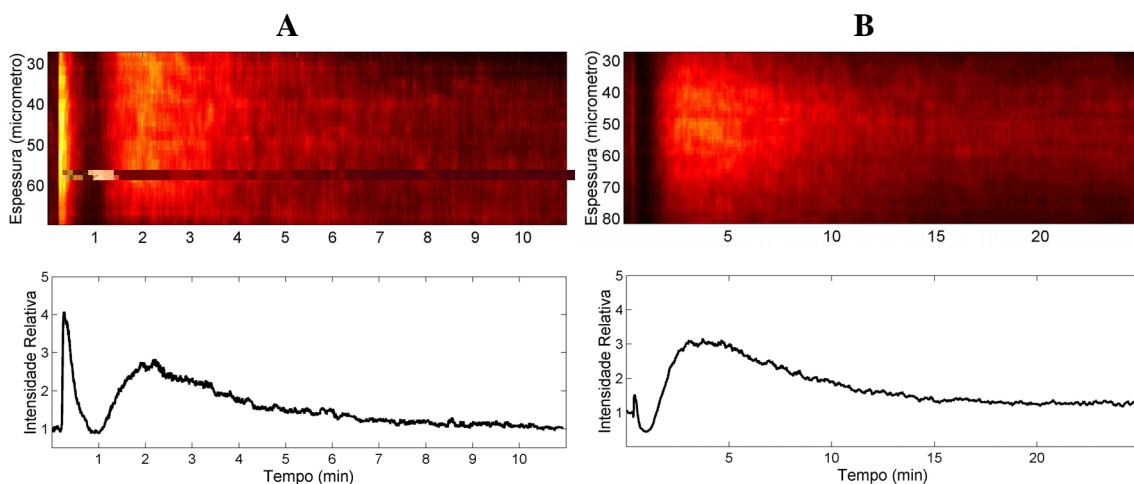


Figura IV.3 - Evolução espacial e temporal do espalhamento de luz durante a onda de DA em retina de ave, para soluções nutrientes de composições diferentes. **A**: solução hipotônica com concentração de NaCl de 60 mM e velocidade de propagação da onda de 5,09 mm/min. **B**: solução hipertônica com concentração de NaCl de 140 mM e velocidade de propagação da onda de 3,61 mm/min.

IV.2 - VELOCIDADE DE PROPAGAÇÃO DA ONDA DE DA

A estimativa da velocidade de propagação de cada onda de DA foi feita com o método do PFO. Para a imagem digitalizada da frente de onda mostrada na figura IV.4, uma janela constituída de 36 linhas por 640 colunas foi determinada para delimitar o espalhamento de luz na IPL. Justapondo o sinal óptico de janelas idênticas de quadros consecutivos forma-se uma imagem única, como ilustrado na figura IV.5. Nesse caso, em função da taxa de amostragem, a frente de onda permaneceu por 49 quadros no campo de visão. Essa figura resume as informações temporais e espaciais da propagação da frente de onda em eixos distintos, sendo o eixo x representado pelo deslocamento da frente de onda e o eixo y pelo tempo decorrido neste deslocamento. Cada janela retangular representa 0,4 s na escala de tempo. Para a escala espacial, cada corresponde a 1,15 μm . Dessa forma, a velocidade dessa onda é igual a 2,42 mm/min, determinada pelo cálculo da tangente do ângulo θ .

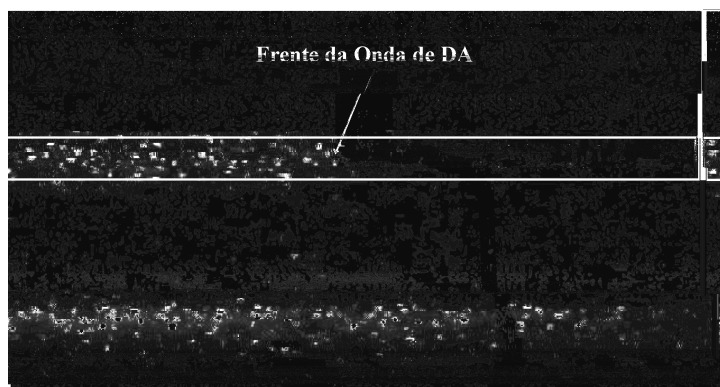


Figura IV.4 - Janela de amostragem da IPL, constituída por 36 linhas e 640 colunas. A seta indica a frente da onda de DA, que propaga-se da esquerda para a direita.

Esta técnica foi aplicada em cada onda de DA registrada. As ondas foram agrupadas considerando-se a concentração de NaCl na solução, a temperatura média da solução ($29,2 \pm 0,2$ °C) e o intervalo de tempo entre as ondas de DA (30 ± 5 min). A aplicação desse método em cada conjunto de ondas resultou em valores médios das velocidades e respectivos desvios padrão conforme mostrado na tabela IV.1.

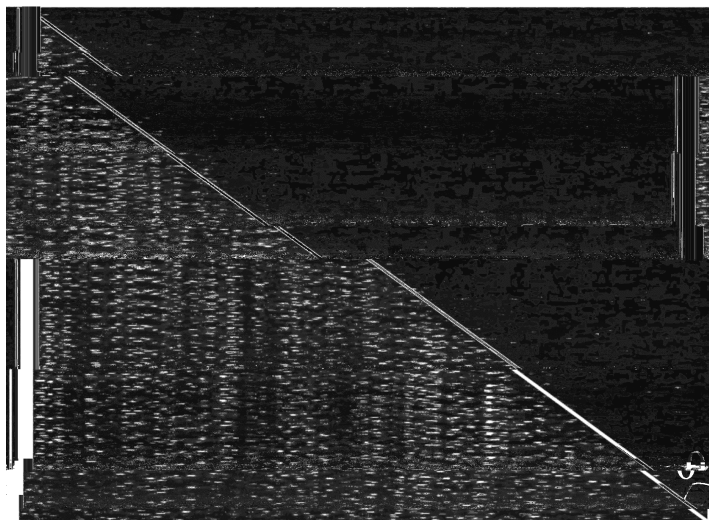


Figura IV.5 - Propagação da frente de onda de 49 quadros consecutivos iniciados na parte superior da figura. Cada janela retangular é composta de 36 linhas por 640 colunas da IPL e representa 0,4 s na escala de tempo. Esta onda apresenta uma velocidade de 2,42 mm/min. Foi utilizada solução nutriente de composição normal.

Tabela IV.1 - Variações da velocidade de propagação da onda de DA em retina de ave em função da concentração de NaCl na solução nutriente. Os dados estão na forma de média \pm DP (desvio padrão). O número de ondas está representado por N. A temperatura média das soluções foi de $29,2 \pm 0,2$ °C.

[NaCl] (mM)	Velocidade (mm/min)	N
140	$1,85 \pm 0,20$	04
120	$2,93 \pm 0,17$	08
100	$3,31 \pm 0,06$	14
80	$4,35 \pm 0,14$	10
60	$5,35 \pm 0,15$	14

Aplicando-se a estatística de Sheffe nos dados da tabela IV.1, pode-se afirmar, com $\alpha = 0,05$ e $P = 10^{-41}$, que todos os grupos apresentam diferenças estatisticamente significantes entre si. Observa-se que a velocidade de propagação da onda de DA aumenta ao reduzir a concentração de NaCl desde 140 até 60 mM na solução de imersão.

IV.3 - EFEITO DA OSMOLARIDADE SOBRE O SINAL ÓPTICO INTRÍNSECO

A trajetória de um raio de luz é composta pela luz retro-espalhada, que não atravessa o tecido, e pela luz refratada, que atravessa o tecido e apresenta três componentes: a luz transmitida, que atravessa toda a espessura do tecido; a luz espalhada, que emerge do tecido em um determinado ângulo em relação ao do feixe incidente; e a luz absorvida, que não emerge o tecido e é perdida em seu interior por absorção. Considera-se que um aumento da intensidade da luz retro-espalhada corresponderá a uma redução da amplitude da luz refratada e, conseqüentemente, a um decréscimo nas amplitudes da luz espalhada e transmitida e vice-versa.

Através da evolução temporal da luz espalhada durante a onda de DA, as alterações das amplitudes dos picos **b** e **d** do sinal óptico e a razão entre eles, **b/d**, foram calculadas em função da variação da concentração de NaCl no meio extracelular e o comprimento de onda da luz incidente. Os dados foram obtidos pela aplicação das equações III.3 a III.5. Os valores médios determinados a partir de um conjunto de sinais e seus respectivos desvios padrão são apresentados nas tabelas IV.2 a IV.4. O teste t de Student foi aplicado a cada conjunto de dados relativo à concentração de NaCl, com $\alpha = 0,05$, para verificar se as médias são estatisticamente iguais para cada fonte de utilizada.

Tabela IV.2 - Variação do primeiro pico máximo do sinal óptico, pico **b**, em função da osmolaridade da solução nutriente, para as fontes de verde e do vermelho. Os dados estão na forma de média \pm DP (desvio padrão). O número de ondas apresenta-se entre parênteses. Temperatura das soluções: $29,2 \pm 0,2$ °C.

[NaCl] (mM)	Pico b		Teste t de Student Médias estatisticamente	P
	Verde	Vermelho		
140	$0,52 \pm 0,20$ (08)	$0,87 \pm 0,55$ (09)	Iguais	1×10^{-1}
120	$0,95 \pm 0,33$ (09)	$1,27 \pm 0,28$ (05)	Iguais	9×10^{-2}
100	$1,61 \pm 0,43$ (09)	$2,94 \pm 0,67$ (12)	Diferentes	3×10^{-5}
80	$1,72 \pm 0,21$ (07)	$2,55 \pm 0,36$ (09)	Diferentes	6×10^{-5}
60	$1,48 \pm 0,29$ (13)	$2,39 \pm 0,52$ (15)	Diferentes	9×10^{-3}

A estatística de Sheffe foi aplicada aos dados da tabela IV.2, com $\alpha = 0,05$, para os picos médios referentes às fontes de $\lambda = 670$ nm nas faixas do verde e do vermelho. Para os comprimentos de onda na faixa do vermelho ($P = 10^{-11}$) e do verde ($P = 10^{-9}$), pode-se afirmar que a amplitude do pico **b** possui médias estatisticamente iguais para valores de concentração de NaCl em 60 e 80 mM e ainda iguais em relação à solução normal. Por outro lado, a amplitude do pico **b** para as concentrações de NaCl de 120 e 140 mM apresenta médias estatisticamente iguais entre si e diferentes em relação à solução normal. Os resultados referentes à amplitude do pico **b** do sinal óptico, em função da variação da concentração de NaCl na solução nutriente, estão ilustrados no gráfico da figura IV.6. Nesta figura, as colunas mais claras correspondem ao $\lambda = 670$ nm verde, enquanto que as mais escuras correspondem ao $\lambda = 670$ nm vermelho.

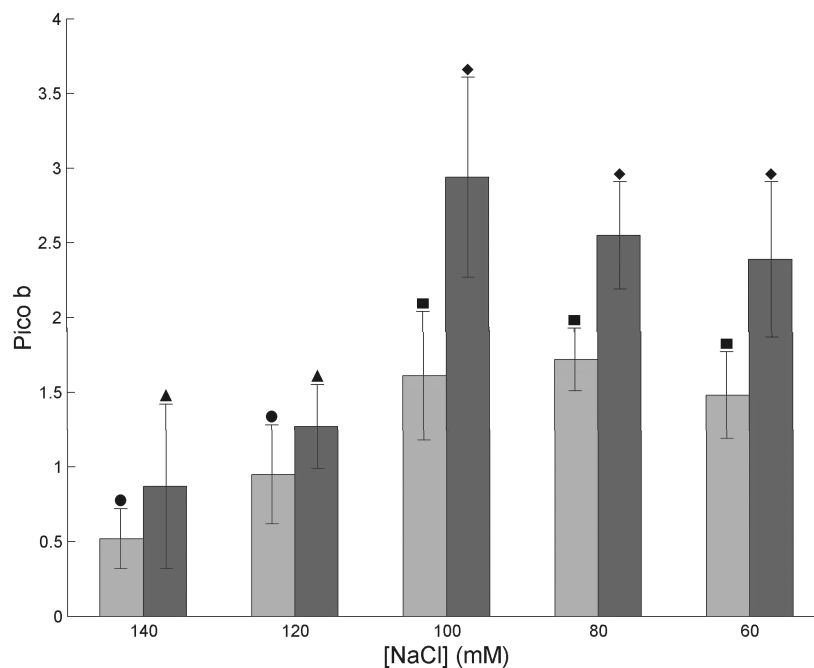


Figura IV.6 - Efeito de reduções sucessivas na concentração de NaCl na solução nutriente sobre o pico **b** do sinal óptico, para as fontes de $\lambda = 670$ nm nas faixas do verde (colunas mais claras) e do vermelho (colunas mais escuras). Abscissa: concentração de NaCl. Ordenada: intensidades do pico. A estatística de Sheffe indica igualdade das médias para o comprimento de onda na faixa do verde entre os grupos: 140 e 120 mM (●); 100, 80 e 60 mM (■). Médias iguais para o comprimento de onda na faixa do vermelho: 140 e 120 mM (▲); 100, 80 e 60 mM (◆).

Tabela IV.3 - Variações do segundo pico máximo do sinal óptico, pico **d**, em função da osmolaridade da solução nutriente, para as fontes de λ_{680} nas faixas do verde e do vermelho. Os dados estão na forma de média \pm DP (desvio padrão). O número de ondas está apresentado entre parênteses. Temperatura das soluções: $29,2 \pm 0,2$ °C.

[NaCl] (mM)	Pico d		Teste t de Student Médias estatisticamente	P
	Verde	Vermelho		
140	$1,85 \pm 0,36$ (08)	$2,33 \pm 0,73$ (09)	Iguais	1×10^{-1}
120	$1,74 \pm 0,51$ (09)	$1,92 \pm 0,51$ (05)	Iguais	6×10^{-1}
100	$1,15 \pm 0,30$ (09)	$1,68 \pm 0,42$ (12)	Diferentes	3×10^{-3}
80	$1,03 \pm 0,15$ (07)	$1,23 \pm 0,26$ (09)	Iguais	7×10^{-2}
60	$0,78 \pm 0,17$ (13)	$1,23 \pm 0,28$ (15)	Diferentes	4×10^{-5}

Os dados referentes à amplitude do pico **d** do sinal óptico são mostrados no gráfico da figura IV.7. As colunas mais claras desta figura correspondem à fonte de λ_{680} na faixa do verde e as mais escuras à do vermelho. Pode-se afirmar pela estatística de Sheffé e com $\alpha = 0,05$, que para a fonte de λ_{680} na faixa do verde ($P = 10^{-9}$) a amplitude do pico **d** do sinal óptico possui médias estatisticamente iguais para as concentrações de NaCl de 120 e 140 mM e diferentes em relação à solução normal. Para as concentrações de 60 e 80 mM, verifica-se que a amplitude do pico **d** possui médias estatisticamente iguais entre si e ainda iguais em relação à solução normal.

Aplicando-se a mesma estatística aos dados referentes à fonte de λ_{680} na faixa do vermelho, pode-se afirmar, com $P = 10^{-6}$, que as médias relativas às concentrações de 120 e 140 mM são estatisticamente iguais entre si. Entretanto, a média relativa à concentração de 120 mM é igual àquela obtida em solução normal, enquanto que a de 140 mM é estatisticamente diferente à média relativa à solução normal. As médias relativas às concentrações de 60 e 80 mM são iguais entre si e ainda iguais em relação à solução normal.

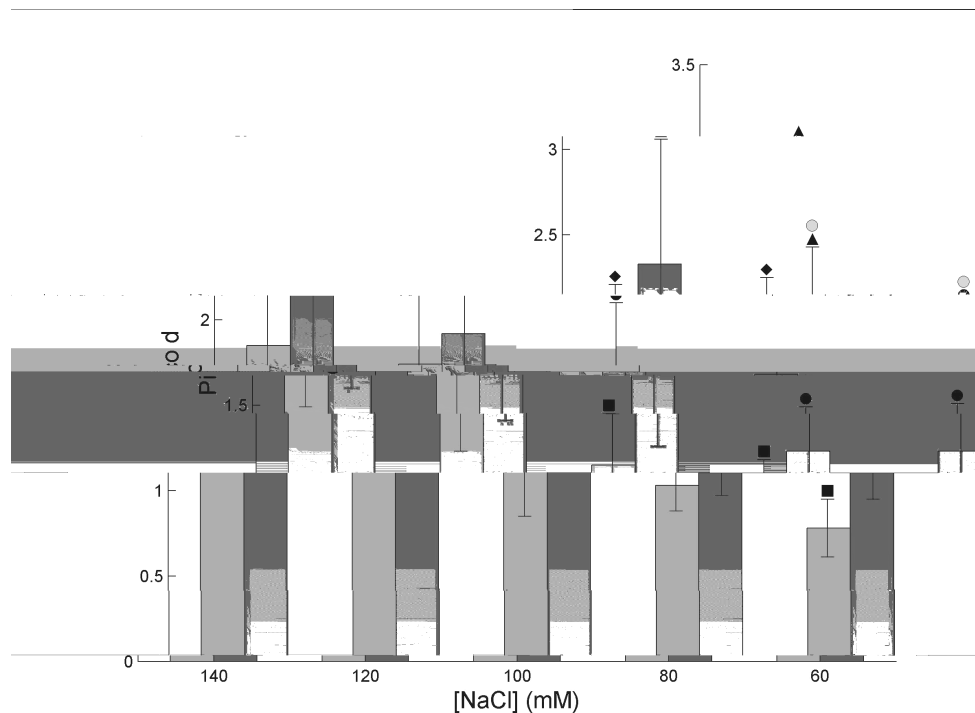


Figura IV.7 - Efeito de reduções sucessivas na concentração de NaCl sobre o pico **d** do sinal óptico, para as fontes de na faixa do verde (colunas mais claras) e do vermelho (colunas mais escuras). Abscissa: concentração de NaCl na solução de imersão da retina. Ordenada: intensidades do pico **d**. A estatística de Sheffe indica médias estatisticamente iguais para o comprimento de onda na faixa do verde entre os grupos: 140 e 120 mM (◆); 120 e 100 mM (○); 100, 80 e 60 mM (■). Médias iguais para o comprimento de onda na faixa do vermelho entre os grupos: 140 e 120 mM (▲); 100, 80 e 60 mM (●).

Tabela IV.4 - Variação da razão entre os picos máximos do sinal óptico, **b/d**, em função da osmolaridade da solução de imersão do tecido, para as fontes de nas faixas do verde e do vermelho. Os dados estão na forma de média \pm DP (desvio padrão). O número de ondas está apresentado entre parênteses. Temperatura das soluções: $29,2 \pm 0,2$ °C.

[NaCl] (mM)	Razão b/d		Teste t de Student Médias estatisticamente	P
	Verde	Vermelho		
140	$0,29 \pm 0,10$ (08)	$0,36 \pm 0,19$ (09)	Iguais	3×10^{-1}
120	$0,54 \pm 0,06$ (09)	$0,67 \pm 0,10$ (05)	Diferentes	3×10^{-2}
100	$1,41 \pm 0,26$ (09)	$1,76 \pm 0,19$ (12)	Diferentes	4×10^{-3}
80	$1,69 \pm 0,20$ (07)	$2,17 \pm 0,64$ (09)	Iguais	6×10^{-2}
60	$1,93 \pm 0,37$ (13)	$2,00 \pm 0,46$ (15)	Iguais	6×10^{-1}

A figura IV.8 mostra os resultados referentes à razão entre os picos máximos do sinal óptico, razão **b/d**, em função das diferentes condições de osmolaridade do NaCl no meio extracelular. A estatística de Sheffe indica, com $\alpha = 0,05$, uma igualdade das médias da razão entre os picos para as concentrações de NaCl iguais a 120 e 140 mM, tanto para a fonte de $\lambda = 540$ nm na faixa do verde ($P = 10^{-18}$) quanto na do vermelho ($P = 10^{-13}$). Entretanto, essas concentrações são estatisticamente diferentes em relação à solução normal. No caso dos grupos hipotônicos, cujas concentrações são 60 e 80 mM, verifica-se que as médias da razão **b/d** são estatisticamente iguais entre si e ainda iguais em relação à solução normal. Observa-se que a razão entre os picos **b** e **d** é estatisticamente diferente apenas para os valores relativos às concentrações normal e a de 120 mM de NaCl.

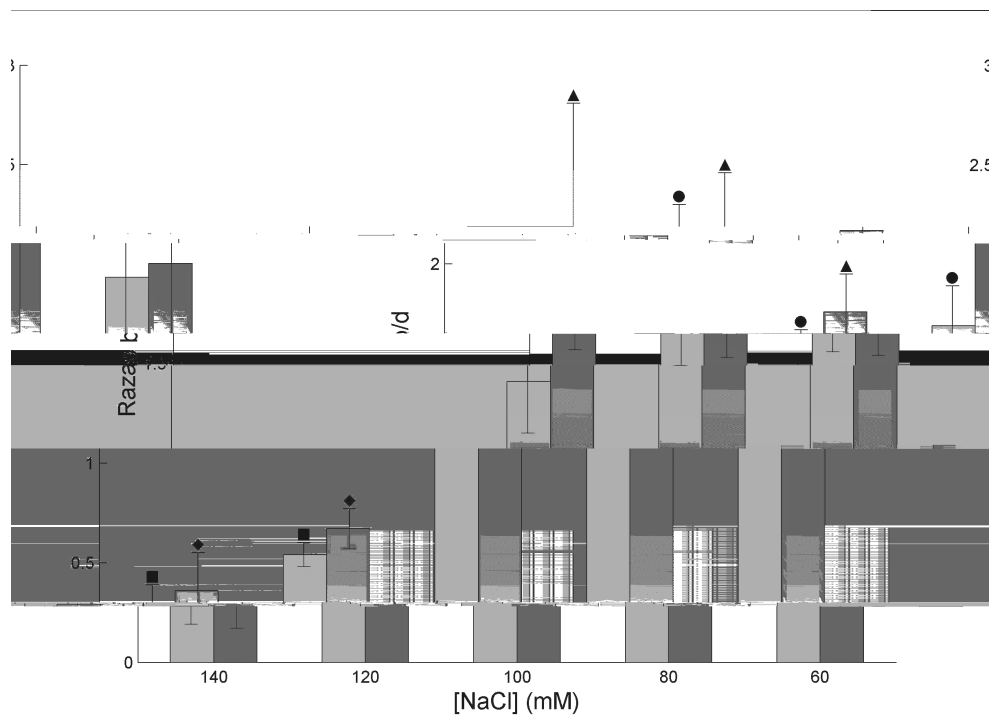


Figura IV.8 - Efeito de reduções sucessivas na concentração de NaCl sobre a razão entre os picos **b** e **d** do sinal óptico, para fontes de $\lambda = 540$ nm na faixa do verde (colunas mais claras) e do vermelho (colunas mais escuras). Abscissa: concentração de NaCl na solução de imersão da retina. Ordenada: valores da razão **b/d**. A estatística de Sheffe indica médias estatisticamente iguais para o comprimento de onda na faixa do verde entre os grupos: 140 e 120 mM (■); 100, 80 e 60 mM (●). Médias iguais para o comprimento de onda na faixa do vermelho entre os grupos: 140 e 120 mM (◆); 100, 80 e 60 mM (▲).

IV.4 - COMPRIMENTO LONGITUDINAL DA FRENTE DE ONDA

O significado de excitabilidade empregado nesse trabalho se refere às condições fisiológicas da retina estarem favoráveis à deflagração e propagação da onda de DA. Assim, a referência a uma condição de maior excitabilidade significará uma condição mais favorável à deflagração e propagação da onda. Por outro lado, a referência à condição de redução da excitabilidade significará condições mais desfavoráveis para a deflagração e propagação da onda. Sendo assim, para verificar a influência da concentração de NaCl na solução nutriente sobre a excitabilidade da retina, o comprimento longitudinal da frente de onda foi determinado por meio da transformação da seqüência temporal do espalhamento de luz em outra espacial. Para cada onda de DA, o vetor representativo do espaço foi calculado através do produto da velocidade pelo vetor tempo referente àquele evento. A seqüência resultante foi representada num sistema de eixos cartesianos, como ilustrado na figura III.9 e os valores relativos ao comprimento longitudinal da frente de onda, pico **b**, e dos picos **c** e **d** do sinal óptico intrínseco foram obtidos através da aplicação das equações III.7 a III.9 em cada sinal. A tabela IV.5 apresenta os valores médios do comprimento dos picos para cada concentração de NaCl na solução do meio extracelular. S_b , S_c e S_d correspondem aos comprimentos dos picos **b**, **c** e **d**, respectivamente.

Tabela IV.5 - Variação do comprimento longitudinal dos picos **b**, **c** e **d** do sinal óptico em função da concentração de NaCl na solução nutriente. Os dados estão na forma de média \pm DP (desvio padrão). O número de ondas apresenta-se entre parênteses. Temperatura das soluções: $29,2 \pm 0,2$ °C.

[NaCl] (mM)	S_b (mm)	S_c (mm)	S_d (mm)
140	$0,74 \pm 0,06$ (10)	$2,46 \pm 0,15$ (06)	-
120	$1,18 \pm 0,14$ (06)	$2,24 \pm 0,19$ (04)	-
100	$1,95 \pm 0,13$ (17)	$1,95 \pm 0,16$ (12)	$42,51 \pm 0,78$ (05)
80	$2,81 \pm 0,13$ (05)	$1,60 \pm 0,07$ (05)	$41,65 \pm 1,27$ (04)
60	$2,97 \pm 0,15$ (05)	$1,57 \pm 0,11$ (04)	$25,64 \pm 1,08$ (03)

Pode-se observar um aumento do comprimento da frente da onda de DA. O valor de S_b aumenta à medida que a concentração de NaCl no meio extracelular diminui. O comprimento da frente de onda possui médias estatisticamente iguais para

valores de concentração de NaCl em 60 e 80 mM e diferentes em relação à solução normal. Por outro lado, o comprimento da frente de onda para as concentrações de NaCl de 120 e 140 mM apresenta médias que são estatisticamente diferentes entre si e ainda diferentes em relação à solução normal. Foi utilizada a estatística de Sheffé, com $\alpha = 0,05$ e $P = 10^{-30}$, para o teste de igualdade das médias.

O comprimento do pico **c** apresenta uma tendência de redução à medida que a concentração de NaCl diminui. Isso caracteriza um comportamento oposto àquele apresentado pelo pico **b** relativo à frente de onda. A aplicação da estatística de Sheffé, com $\alpha = 0,05$ e $P = 10^{-10}$, mostra que as médias relativas às concentrações de 120 e 140 mM são estatisticamente iguais entre si e diferentes em relação à solução normal. As médias relativas às concentrações de 60 e 80 mM são iguais entre si e ainda diferentes em relação à solução normal.

Os resultados referentes ao comprimento do pico **c** do sinal óptico, normalizados pelo valor obtido em solução normal, estão ilustrados no gráfico da figura IV.9A. Esse gráfico foi construído com os dados correspondentes à coluna **S_c** da tabela IV.5. O comprimento do pico **c** apresenta uma redução à medida que a concentração de NaCl diminui.

Para analisar o comprimento do pico **d**, foram utilizados apenas os dados relativos às concentrações de NaCl iguais a 100, 80 e 60 mM. Em meio hipertônico a parte final da evolução temporal do sinal óptico parece ter sua constante de tempo ampliada com o aumento da concentração de NaCl. Existe uma tendência da intensidade do sinal para se aproximar, como assíntota, de um valor constante e superior àquele correspondente ao valor de base. Portanto, o tempo de gravação de 30 min não foi suficiente para o retorno da intensidade de luz ao valor de base para aqueles experimentos. Para as soluções normal e hipotônicas, observa-se que o comprimento do pico **d** apresenta uma tendência para diminuir com a redução da concentração de NaCl na solução nutriente. Pela estatística de Sheffé, pode-se afirmar que existem diferenças estatisticamente significantes, com $\alpha = 0,05$ e $P = 10^{-8}$, entre o grupo de concentração de NaCl de 100 mM e aqueles correspondentes às concentrações de 60 e 80 mM. No

entanto, as médias dos comprimentos do pico **d** para as concentrações de 60 e 80 mM são estatisticamente iguais.

Os resultados referentes ao comprimento do pico **d** também foram normalizados pelo valor obtido em solução normal e são mostrados na figura IV.9B. Para a construção desta curva foram utilizados os dados correspondentes à coluna **S_d** da tabela IV.5. Nessa faixa, o comprimento do pico **d** diminui com a redução da concentração de NaCl.

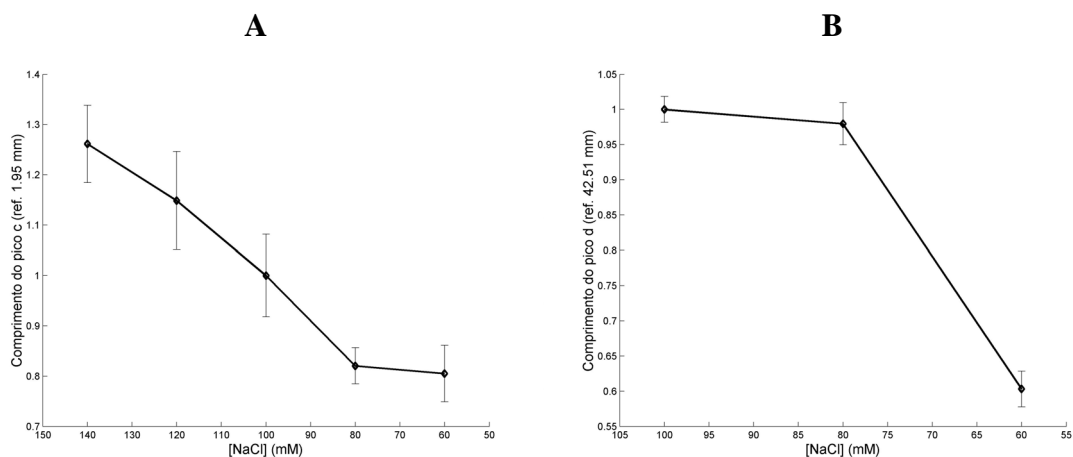


Figura IV.9 - Efeito da variação da concentração de NaCl na solução nutriente sobre o comprimento dos picos **c** e **d** do sinal óptico intrínseco. **A** - registros do comprimento relativo do pico **c** do sinal óptico intrínseco durante passagem da onda de DA. **B** - registros do comprimento do pico **d**. Abscissa: concentração de NaCl na solução de imersão da retina. Ordenada: Comprimento médio relativo dos picos **c** (**A**) e **d** (**B**). Observa-se que tanto o pico **c** quanto o pico **d** diminuem com a redução da concentração de NaCl.

IV.5 - POTENCIAL EXTRACELULAR

A posição do microeletrodo de registro do potencial extracelular foi estimada em relação à camada plexiforme interna, utilizando-se a equação III.10. Considerando duas retas paralelas definindo as bordas superior e inferior da IPL e que a reta superior é estimada como referência para uma medida de distância, o valor médio para o posicionamento da ponta do microeletrodo de registro foi de $52 \pm 7\%$ da IPL (média \pm DP). A ponta do microeletrodo encontra-se, portanto, praticamente no centro

da IPL. Os valores de pico do potencial extracelular foram medidos e agrupados em função da concentração de NaCl no meio extracelular. Assim, para cada solução nutriente utilizada, as médias dos valores de pico dos potenciais e seus respectivos desvios padrão foram calculados e estão apresentados na tabela IV.6.

Tabela IV.6 - Variação da intensidade do potencial extracelular em função da concentração de NaCl na solução nutriente durante a onda de DA. Os dados estão na forma de média \pm DP (DP = desvio padrão). O número de ondas está representado por N. Temperatura das soluções: $29,2 \pm 0,2$ °C.

[NaCl] (mM)	Potencial DC (mV)	N
140	$13,62 \pm 1,39$	6
120	$14,36 \pm 1,04$	4
100	$17,61 \pm 0,47$	8
80	$20,92 \pm 0,66$	5
60	$22,22 \pm 0,38$	7

A aplicação da estatística de Sheffé nos dados da tabela IV.6, com $\alpha = 0,05$ e $P = 10^{-16}$, mostra que as médias relativas às concentrações de 120 e 140 mM são estatisticamente iguais entre si e diferentes em relação à solução normal. As médias relativas às concentrações de 60 e 80 mM são iguais entre si e ainda diferentes em relação à solução normal. Observa-se que a amplitude do potencial extracelular aumenta com a redução da concentração de NaCl desde 140 até 60 mM na solução de imersão. Normalizando-se os dados da tabela IV.6 em relação ao valor correspondente à solução normal, os resultados são apresentados graficamente na figura IV.10. O gráfico desta figura mostra a influência da concentração de NaCl na solução de imersão da retina sobre o valor de pico do potencial extracelular.

O efeito da variação na concentração de NaCl na solução nutriente foi também verificado sobre o comprimento longitudinal do potencial extracelular. Este comprimento foi determinado para cada onda de DA, de forma similar ao comprimento obtido para a frente de onda, como descrito na seção III.2.7. A tabela IV.7 apresenta os valores médios do comprimento deste potencial para cada concentração de NaCl na solução do meio extracelular.

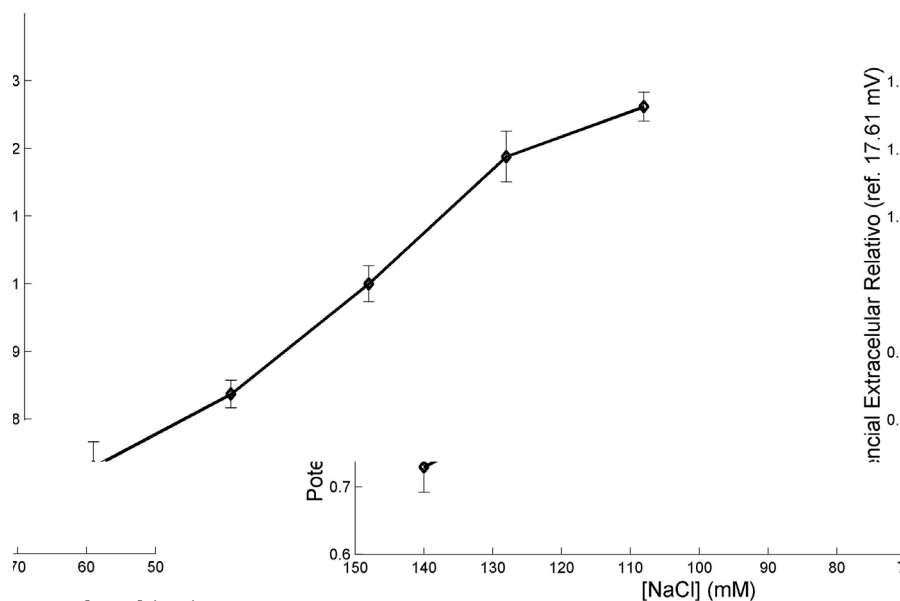


Figura IV.10 - Efeito de reduções sucessivas na concentração de NaCl na solução nutriente sobre a amplitude do pico do potencial extracelular. Abscissa: concentração de NaCl. Ordenada: valores relativos do potencial extracelular em relação àqueles obtidos sob condição normal (17,61 mV).

Tabela IV.7 - Variações do comprimento longitudinal do potencial extracelular em função da concentração de NaCl na solução de imersão da retina. Os dados estão na forma de média \pm DP (desvio padrão). O número de ondas está representado por N. Temperatura das soluções: $29,2 \pm 0,2$ °C.

[NaCl] (mM)	Comprimento do Potencial Extracelular (mm)	N
140	$1,65 \pm 0,58$	7
120	$2,07 \pm 0,67$	5
100	$2,41 \pm 0,29$	25
80	$3,17 \pm 0,40$	11
60	$3,96 \pm 0,31$	19

Aplicando-se a estatística de Sheffe aos dados da tabela IV.7, pode-se afirmar, com $\alpha = 0,05$ e $P = 10^{-22}$, que as médias relativas às concentrações de 120 e 140 mM são iguais entre si. A média relativa à concentração de 120 mM é estatisticamente igual à média relativa à solução normal, enquanto que a de 140 mM é diferente em relação à solução normal. Para os grupos hipotônicos, cujas concentrações de NaCl são 60 e

80 mM, as médias são diferentes entre si e ainda diferentes em relação à solução normal.

Os dados da tabela IV.7 foram normalizados em relação ao comprimento do potencial DC sob condições normais e os resultados são apresentados graficamente, como mostra a figura IV.11. O gráfico desta figura mostra que o comprimento longitudinal do potencial extracelular aumenta com a redução da concentração de NaCl na solução nutriente. Esta mesma tendência é observada tanto para a velocidade de propagação da onda de DA quanto para o comprimento longitudinal da frente de onda.

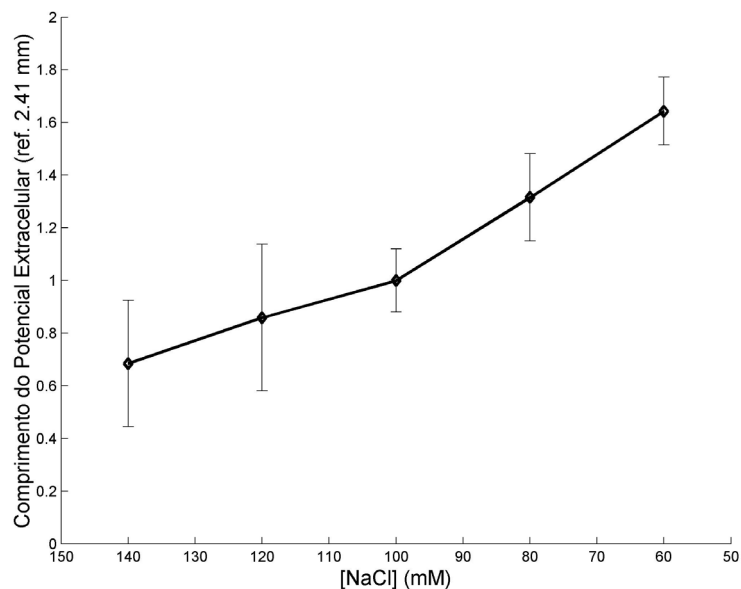


Figura IV.11 - Efeito de reduções sucessivas na concentração de NaCl na solução nutriente sobre o comprimento longitudinal do potencial extracelular. Abscissa: concentração de NaCl. Ordenada: valores relativos do comprimento do potencial extracelular em relação àqueles obtidos sob condição normal (2,41 mm).

IV.6 - ESPESSURA DA CAMADA PLEXIFORME INTERNA

Como descrito na seção III.2.9, para cada retina utilizada, a espessura da IPL foi definida a partir de um quadro de referência e foi estimada por meio da diferença, em , entre duas retas paralelas que definiram a região da camada plexiforme interna

antes da passagem da onda de DA. Esta estimativa foi feita para cada concentração de NaCl, com objetivo de verificar a existência de alguma variação da espessura da IPL, após a perfusão de soluções hiper e hipotônicas, em equilíbrio osmótico. A tabela IV.8 apresenta as médias das espessuras e seus respectivos desvios padrão, em μm .

Aplicando-se a estatística de Sheffe nos dados da tabela IV.8, pode-se afirmar, com $\alpha = 0,05$ e $P = 10^{-20}$, que as médias relativas às concentrações de 120 e 140 mM são estatisticamente iguais entre si e diferentes em relação à solução normal. As médias relativas às concentrações de 60 e 80 mM também são iguais entre si. Entretanto, a média relativa à concentração de 60 mM é diferente em relação à solução normal, enquanto que a de 80 mM é estatisticamente igual à média relativa à solução normal.

Tabela IV.8 - Variações da espessura da IPL em função da osmolaridade das soluções nutrientes utilizadas nos experimentos antes da passagem da onda de DA. Os dados estão na forma de média \pm DP (desvio padrão). O número de ondas está representado por N na coluna à direita. A temperatura das soluções durante o experimento foi de $29,2 \pm 0,2$ °C.

[NaCl] (mM)	Espessura (μm)	N
140	$39,3 \pm 1,9$	26
120	$41,3 \pm 2,7$	20
100	$44,0 \pm 1,6$	33
80	$44,1 \pm 3,0$	15
60	$46,0 \pm 2,8$	42

Os resultados referentes à variação da espessura da IPL foram normalizados pelo valor obtido em solução normal e são apresentados no gráfico da figura IV.12. Este gráfico foi construído com os dados da tabela IV.8. Observa-se que a espessura da IPL apresenta uma tendência para aumentar com a redução da concentração de NaCl, desde 140 até 60 mM.

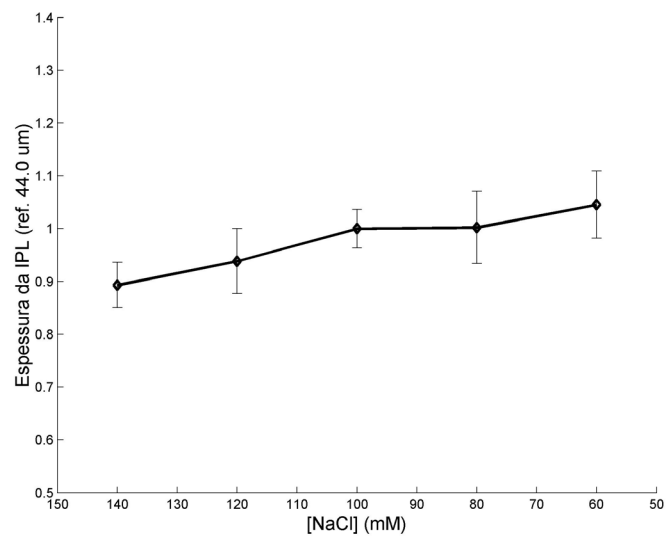


Figura IV.12 - Efeito da diminuição de NaCl na solução de imersão da retina sobre a espessura da camada plexiforme interna em experimentos com onda de DA. Abscissa: concentração de NaCl. Ordenada: valores relativos da espessura da retina em relação àqueles obtidos na solução normal (44,0 μm).

CAPÍTULO V - DISCUSSÃO

V.1 - ESPALHAMENTO DE LUZ NAS CAMADAS DA RETINA DURANTE A ONDA DE DA

A técnica de construção da ETEL permitiu a observação do sinal óptico durante a onda de DA em todas as camadas da retina, bem como a quantificação das correspondentes variações ópticas que ocorrem ao longo da reação, para cada condição de osmolaridade do meio extracelular. Segundo DUARTE (2000), a ETEL apresenta outras potencialidades além de constituir-se em uma importante ferramenta para a visualização compacta de cada camada do tecido e quantificação das correspondentes variações ópticas como, por exemplo:

- registro da velocidade de propagação da frente de onda;
- perfil do potencial extracelular ao longo das camadas da retina;
- avaliação qualitativa da variação da espessura do tecido durante a onda de DA;
- registro da variação da luz espalhada ou transmitida em função da alteração da osmolaridade do meio extracelular na ausência da onda de DA;
- variação da espessura da IPL durante a alteração da osmolaridade na ausência da onda de DA.

Nesse trabalho, a técnica da ETEL possibilitou o estudo dos parâmetros que se seguem, após o equilíbrio osmótico ser atingido:

- as alterações na seqüência temporal do espalhamento de luz durante a passagem da onda de DA;
- a estimativa da velocidade de propagação da onda de DA em meios de diferentes osmolaridades;
- as variações na intensidade dos picos máximos do sinal óptico intrínseco;
- as variações nos comprimentos longitudinais da frente de onda (pico **b**) e dos picos **c** e **d** do sinal óptico.

A morfologia do sinal óptico na IPL apresentado neste trabalho é consistente com aquela descrita por MARTINS-FERREIRA e OLIVEIRA CASTRO (1966), cujos registros da luz retro-espalhada foram feitos em fatias isoladas de retina de ave. Baseados em dados experimentais, esses autores sugeriram a forte dependência entre a dinâmica do sinal óptico e a osmolaridade do meio extracelular. A figura V.1 mostra as alterações visuais do espalhamento de luz em retina, durante a passagem da onda de DA, em condições hipo e hipertônicas, fora do equilíbrio osmótico. As soluções utilizadas por eles apresentaram uma variação na concentração de NaCl de 20 a 30% para mais ou para menos em relação àquela solução normal, enquanto que neste trabalho, foram utilizadas soluções apresentando uma variação na concentração de NaCl de 20 e de 40% para mais e para menos em relação à normal. Martins-Ferreira e Oliveira Castro verificaram que a variação na concentração de NaCl na solução de imersão da retina provocou alterações nas características de transparência do tecido. Sob condições hipertônicas, a retina tornou-se mais opaca, enquanto que em meio hipotônico, houve um aumento da transparência e a seqüência temporal do espalhamento de luz junto à frente de onda foi similar àquela obtida sob condições normais.

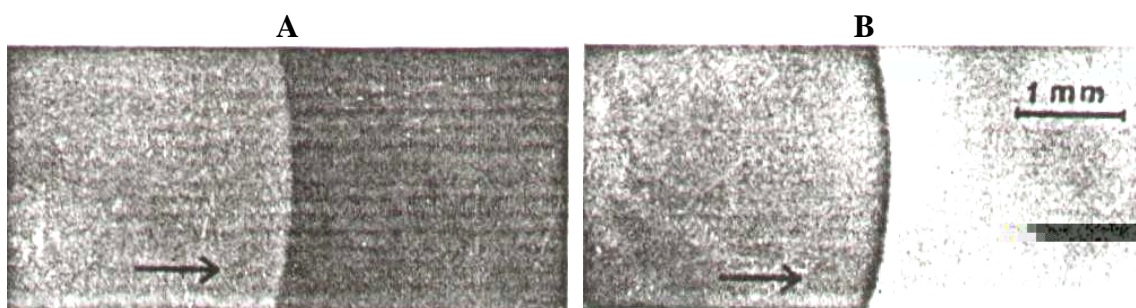


Figura V.1 - Registros das variações ópticas em retina de ave durante a passagem das ondas de DA. **A**: retina imersa em solução hipotônica. **B**: retina imersa em solução hipertônica. As soluções utilizadas apresentaram uma variação na concentração de NaCl. As setas indicam a direção de propagação da onda. (Adaptada de MARTINS-FERREIRA e OLIVEIRA CASTRO, 1966)

A distinção encontrada entre os tipos de solução foi caracterizada na condição hipertônica, onde a frente de onda aparece como uma faixa escura, como apresentado na figura V.1B. Essa faixa escura também se manifestou nas condições de equilíbrio osmótico, como pode ser observada na ETEL apresentada na figura V.2, que é

reprodução da figura IV.3B. Esta faixa escura pode ser interpretada, nesse momento, como uma significativa redução na intensidade do pico **b** em condições hipertônicas, como pode ser verificado na parte inferior da figura V.2.

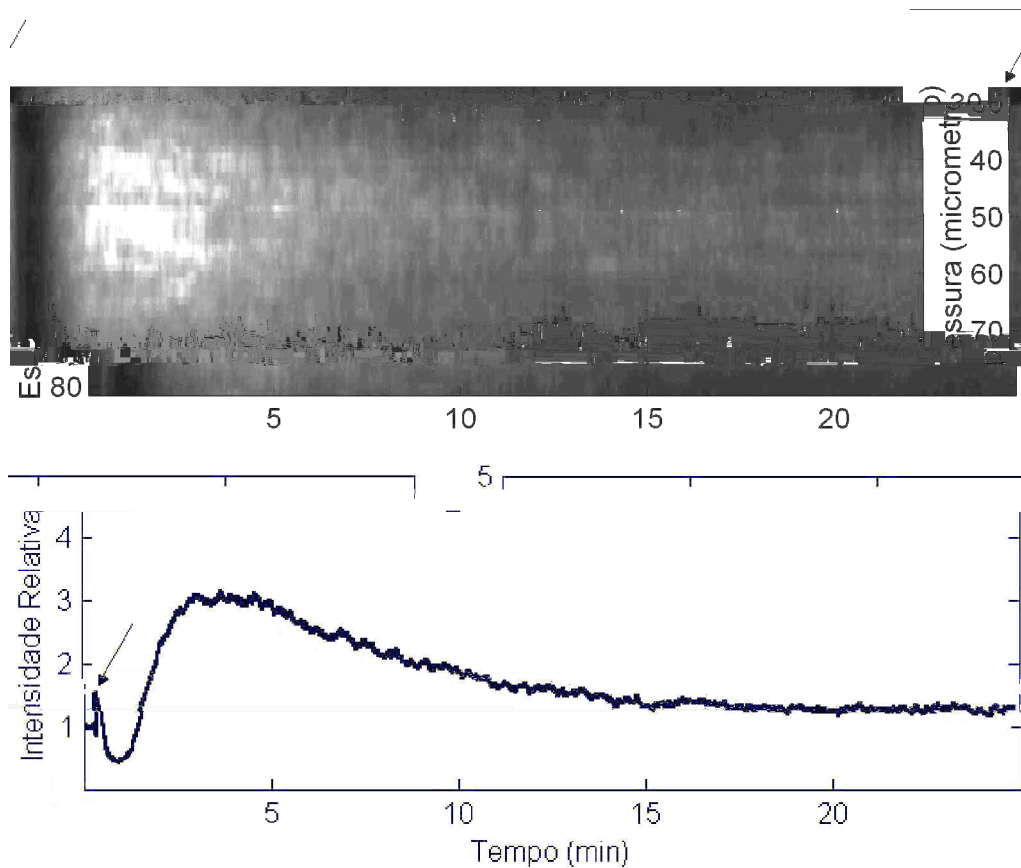


Figura V.2 - Evolução espacial e temporal do espalhamento de luz durante a onda de DA em retina de ave para solução nutriente hipertônica de 140 mM. As setas nas partes superior e inferior desta figura apontam para a faixa escura na ETEL (superior) e redução na amplitude do pico **b** na seqüência temporal (inferior).

Comparando-se esse resultado com um similar da literatura (parte superior da figura II.9) pode-se inferir sobre a diferença na intensidade do espalhamento de luz referente à linha de base sob dois aspectos. Deve-se considerar que os experimentos realizados por Martins-Ferreira e Oliveira Castro parecem ter sido feitos em condições fora do equilíbrio osmótico, dadas as características de seus resultados. Além disso, em meio hipertônico a retina fica mais opaca fora do equilíbrio e, conseqüentemente, a luz retro-espalhada, medida por eles apresenta uma intensidade maior, o que implica em redução da luz refratada medida nesse trabalho. Assim, observa-se que a intensidade do

pico **b** é inferior à linha base em condições fora do equilíbrio osmótico, como mostrado nas curvas 2 e 3 da parte superior da figura II.9. Entretanto, em condições de equilíbrio osmótico, a intensidade desse pico é superior à linha base, como indicado na parte inferior da figura V.2. DUARTE (2000) analisou os efeitos da geometria e índices de refração dos meios extra e intracelulares e apontou para a forte influência desses parâmetros sobre o espalhamento de luz. Em condições de equilíbrio osmótico, o índice de refração relativo (razão entre os índices correspondentes do meio extra e aquele do meio intracelular) se encontra próximo da unidade, o que representa uma condição de alta transmitância da luz. Sendo assim, na região à frente de onda, a faixa escura pode ser interpretada como a região onde o índice de refração relativo está muito próximo da unidade. Com esta elevada transmitância, tanto a luz retro-espalhada quanto a refratada teriam suas amplitudes reduzidas. Assim, fora do equilíbrio era de se esperar que a intensidade da linha de base fosse maior dado que o índice de refração é maior que a unidade. Ao longo da depressão alastrante, a grande movimentação iônica controlará os índices de refração e a geometria do tecido, resultando em sinais com dinâmicas similares independente do método de medição do sinal óptico.

V.2 - VELOCIDADE DE PROPAGAÇÃO DA ONDA DE DA

MARROCOS e MARTINS-FERREIRA (1990) indicaram a velocidade de propagação da onda de DA como uma característica intrínseca desse fenômeno. Segundo MARTINS-FERREIRA (1983), a velocidade de propagação pode ser determinada através das alterações no sinal óptico durante a ocorrência da onda de DA.

A técnica utilizada neste trabalho, proposta por DUARTE (2000), permitiu o cálculo da velocidade através do sinal óptico intrínseco que acompanha a onda de DA. Essa técnica não utiliza eletrodos de registro do potencial extracelular, mas tão somente imagens digitalizadas da frente de onda se propagando no campo de visão. O autor sugere que a aplicação dessa metodologia, além de ser útil para a determinação da velocidade, também pode ser utilizada para o estudo dos mecanismos de propagação da onda de DA.

Neste trabalho, a velocidade de propagação da reação em retina de ave, imersa em solução nutriente normal e temperatura de $29,0 \pm 0,2$ °C, foi determinada para 14 ondas individuais e o valor obtido foi de $3,31 \pm 0,06$ mm/min. Esse resultado apresenta boa concordância com aqueles descritos na literatura (DUARTE, 2000), cujas velocidades de propagação de ondas individuais são $4,85 \pm 0,81$ mm/min, embora as condições experimentais das soluções denominadas normais sejam ligeiramente diferentes em sua composição.

Além da solução normal, outras soluções de osmolaridades diferentes foram utilizadas para verificar a influência da concentração de NaCl na solução nutriente sobre a velocidade de propagação da onda de DA. A técnica do PFO foi aplicada a cada onda de DA nas respectivas condições experimentais. Os resultados apresentados na tabela IV.1 foram normalizados em relação à solução normal e estão reproduzidos graficamente na figura V.3.

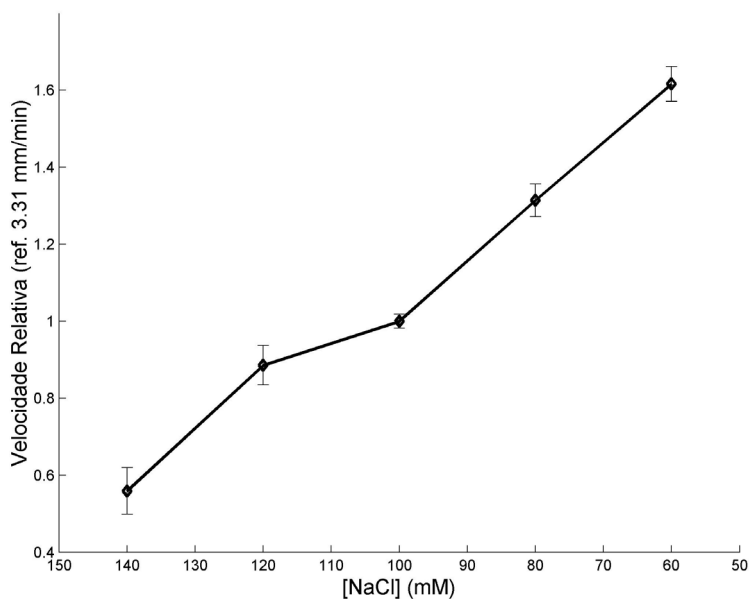


Figura V.3 - Efeito de reduções sucessivas na concentração de NaCl na solução de imersão da retina sobre a velocidade de propagação da onda de DA. Abscissa: concentração de NaCl. Ordenada: valores relativos da velocidade de propagação da onda em relação àqueles obtidos na solução normal.

O gráfico mostrado na figura V.3 aponta para uma relação inversa entre a velocidade de propagação e a concentração de NaCl. Uma redução na concentração de NaCl causa um aumento na velocidade de propagação da onda de DA. Esses resultados são consistentes com a literatura (MARROCOS e MARTINS-FERREIRA, 1990), cujos dados experimentais são apresentados na figura V.4. Comparando as velocidades relativas para as concentrações de NaCl iguais a 100, 80 e 60 mM nos gráficos das figuras V.3 e V.4, observa-se que os valores estão muito próximos e com tendências similares.

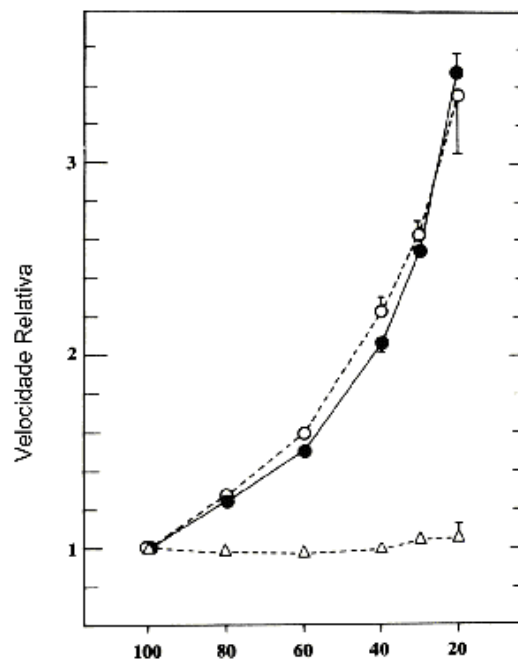


Figura V.4 - Efeito de reduções sucessivas na concentração de NaCl na solução nutriente sobre a velocidade de propagação da onda de DA. Abscissa: concentração de NaCl após remoção parcial de NaCl (●), substituição por isotionato de sódio (○) ou por Tris-cloreto (△). Ordenada: valores relativos da velocidade de propagação em relação àquelas obtidos na solução nutriente inicial. Os dados estão na forma de média \pm DP para cinco experimentos. (Adaptada de MARROCOS e MARTINS-FERREIRA, 1990)

MARROCOS e MARTINS-FERREIRA (1990) analisaram seus resultados buscando identificar qual íon tinha efeito majoritário sobre essa característica. Eles observaram que a redução progressiva do íon cloreto provocava um aumento na velocidade de propagação da onda, enquanto que a influência da concentração do íon sódio presente no meio extracelular sobre a velocidade de propagação da onda era

mínima. A partir de tais evidências, eles sugeriram que a velocidade de propagação da onda não é necessariamente dependente da concentração de Na^+ , mas sim da concentração de Cl^- . Isso talvez decorra da atuação do Cl^- se dar sobre o potencial transmembrânico, variando este potencial no sentido positivo, ou seja, despolarizando as membranas dos terminais sinápticos e, por conseguinte, aumentando a excitabilidade do sistema (TEIXEIRA, 2000).

Os resultados apresentados na figura V.3 foram ainda comparados com resultados de simulação computacional da depressão alastrante feita por TEIXEIRA (2000). O modelo matemático desenvolvido por TEIXEIRA (2001) é um modelo eletroquímico baseado na eletrodifusão. Esse modelo, mais realístico que os equivalentes elétricos, incorpora vários mecanismos de transporte tais como transportes ativos e passivos. TEIXEIRA (2001) simularam ondas de DA quando da variação da concentração de NaCl no meio extracelular. Os resultados específicos de velocidade em função da variação de NaCl estão apresentados na figura V.5. O gráfico relaciona a velocidade de propagação da onda de DA com as diferentes condições de composição iônica extracelular em relação à solução nutriente normal. Observa-se que a redução da concentração de NaCl resultou em um aumento na velocidade de propagação da onda. Também nesse caso, nota-se que os resultados dessa simulação são consistentes com os resultados experimentais apresentados na figura V.3, dentro da correspondente faixa de variação da concentração de NaCl.

TEIXEIRA (2001) também analisaram, computacionalmente, a influência de cada íon de NaCl sobre a variação da velocidade de propagação da onda e verificaram que a influência do íon Cl^- prevalece sobre a variação da velocidade, enquanto que o íon Na^+ tem pouca influência sobre essa variação. Pode-se depreender que a redução do íon Cl^- na solução de imersão da retina causa, em regiões adjacentes, despolarizações mais acentuadas, o que pode ser interpretado como um aumento da excitabilidade do tecido e a susceptibilidade à reação, resultando em um aumento da velocidade de propagação.

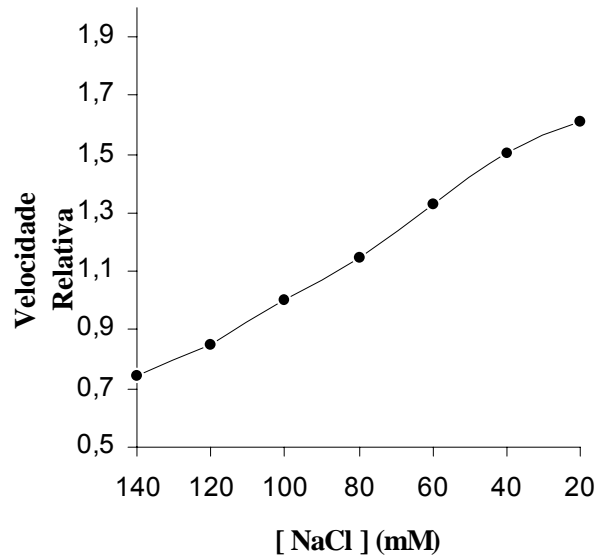


Figura V.5 - Resultados de simulação computacional da onda de DA. Efeito da diminuição da concentração de NaCl sobre a velocidade de propagação da onda para situações de eletrodifusão iônica extracelular em relação à velocidade de propagação normal, 3,73 mm/min. (Adaptada de TEIXEIRA, 2000)

V.3 - EFEITO DA OSMOLARIDADE SOBRE O SINAL ÓPTICO INTRÍNSECO

OLIVEIRA CASTRO (1985) estudaram a influência do comprimento de onda da luz incidente sobre os picos **b** e **d** do sinal óptico da onda de DA. Eles verificaram, através de luz retro-espalhada, que as intensidades dos picos **b** e **d** são diferentemente afetadas pelo comprimento de onda da luz incidente. O pico **b** apresenta uma sensibilidade maior para o comprimento de onda da luz incidente que o pico **d**. A figura V.6A, que é reprodução da figura II.8, apresenta os resultados desses pesquisadores mostrando as alterações nas intensidades dos picos em função do comprimento de onda da luz incidente para o caso de solução normal. A figura V.6B mostra o resultado obtido neste trabalho também para a condição de solução normal. Pode-se observar que a tendência dos presentes resultados é invertida em relação àquela apresentada por OLIVEIRA CASTRO e colaboradores. Supõe-se que essa inversão se deve ao aumento da luz retro-espalhada implicar em redução da luz ortogonalmente espalhada que é a utilizada neste trabalho. Portanto, para o comprimento de onda na faixa do vermelho obteve-se uma intensidade maior que aquela verificada na faixa do verde. Dessa forma, os resultados apresentados neste trabalho são coerentes com

aqueles referentes aos dados experimentais de OLIVEIRA CASTRO (1985), apesar da diferença na composição da solução de Ringer.

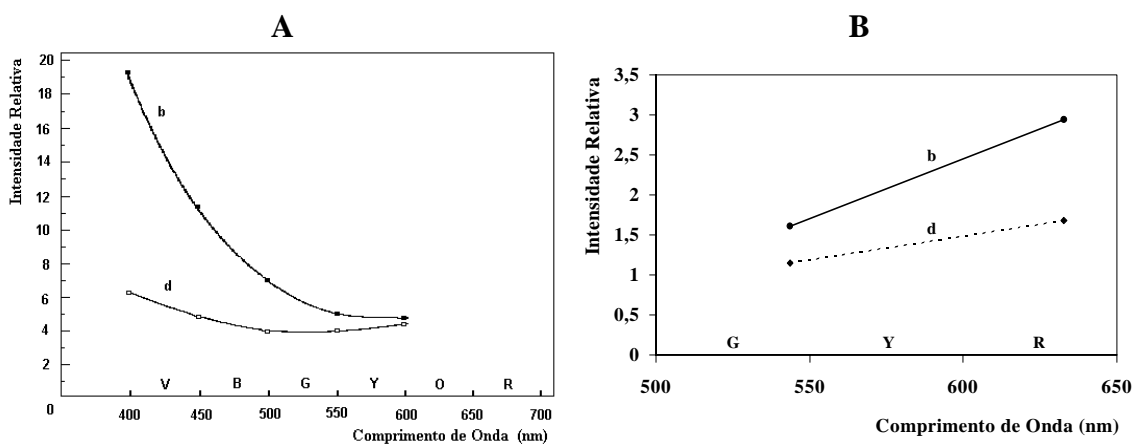


Figura V.6 - Intensidades relativas dos picos máximos, **b** e **d**, do sinal óptico intrínseco em função do comprimento de onda da luz incidente sob condições normais. **A**: Intensidades relativas dos picos máximos **b** (●) e **d** (○) do sinal óptico e o comprimento de onda da luz incidente, onde V - violeta; B - azul; G - verde; Y - amarelo; O - laranja; R - vermelho (Adaptada de OLIVEIRA CASTRO, 1985). **B**: Intensidades relativas dos picos máximos **b** (●) e **d** (◆) e o comprimento de onda da luz incidente, onde G - verde, Y - amarelo, R - vermelho.

Ao se observar o comportamento dos valores médios mostrados na figura IV.6, a intensidade do pico **b** apresenta uma tendência de queda em relação à concentração normal. Para o comprimento de onda na faixa do vermelho, em meios hipotônicos, o pico **b** apresentou tendência de queda, mas com valores maiores que a tendência de queda registrada em meios hipertônicos. Uma tendência semelhante é verificada para o comprimento de onda na faixa do verde.

Os valores médios em meios hipotônicos são estatisticamente diferentes daqueles apresentados em meios hipertônicos. Isto pode significar que os canais iônicos, responsáveis pela liberação maciça dos íons K^+ para o meio extracelular e aqueles responsáveis pelo influxo dos íons Na^+ , Cl^- e Ca^{2+} para o meio intracelular, apresentam comportamentos distintos em meios de diferentes osmolaridades. Esses resultados corroboram a hipótese de que a intensidade do pico **b** pode ser, além da movimentação iônica, dependente também da excitabilidade do tecido. Em meios hipotônicos, com baixa concentração de cloreto, a excitabilidade foi maior (TEIXEIRA, 2000), e

conseqüentemente, a intensidade do pico **b** aumentou. Portanto, esses resultados sugerem que o aumento da excitabilidade além de provocar um aumento da intensidade do potencial extracelular (analisada na seção V.5) também aumenta a intensidade do pico **b**.

O pico **d** apresenta um comportamento distinto daquele indicado pelo pico **b**. Os resultados médios mostram que a intensidade do pico **d** apresenta uma tendência de queda desde o meio mais hipertônico (140 mM de NaCl) até o meio mais hipotônico, (60 mM de NaCl) tanto para o comprimento de onda da luz incidente na faixa do vermelho quanto para aquele da faixa do verde (figura IV.7). Esta distinção nesses resultados indica e parece confirmar a hipótese de que mecanismos distintos controlam os dois picos do sinal óptico (OLIVEIRA CASTRO, 1985). Além disso, os resultados também indicam que os mecanismos de recuperação dos gradientes iônicos do tecido também são afetados em meios de diferentes osmolaridades, sendo que os valores médios dos meios hipertônicos são estatisticamente diferentes daqueles referentes aos meios hipotônicos.

O comportamento distinto dos dois picos máximos do sinal óptico em função da osmolaridade variável resultou na razão **b/d**, mostrada na figura IV.8. Verifica-se, tanto para o comprimento de onda na faixa do vermelho quanto para aquele da faixa do verde, que a tendência dessa razão é crescente com a redução da osmolaridade. Para o caso da solução normal e condições experimentais similares, os resultados apresentados neste trabalho estão em concordância com aqueles descritos por DUARTE (2000), como mostrado na figura V.8. Observa-se, nesta figura, que os valores médios dos dados indicam que para o comprimento da luz incidente na faixa do vermelho a razão **b/d** mantém a tendência da solução normal, isto é, de ser maior que aquela relativa ao comprimento de onda na faixa do verde.

Os resultados apresentados sobre o efeito da osmolaridade sobre o sinal óptico intrínseco, mostrados nesta seção, ainda não devem ser considerados conclusivos em função da variabilidade verificada pelos desvios padrão, que pode ter sido decorrente da resolução espacial das imagens digitalizadas. Neste trabalho, utilizou-se uma taxa de amostragem do vídeo em torno de 2 quadros/s. Apesar da técnica de construção da ETEL ser considerada eficiente, essa taxa implicou em um sinal óptico com um nível de

ruído que pode ter contribuído para a sua variabilidade. Associado a esta fonte de erro, ainda pode-se contabilizar o baixo número de experimentos aproveitados para esse tipo de análise. Por vários motivos, diversos sinais foram prejudicados por falhas externas como problemas com ruídos ópticos e elétricos em excesso. Os experimentos foram feitos com máximo controle sobre essas variáveis externas, porém, a influência desses fatores prejudicou a obtenção de um maior número de resultados. A realização de mais experimentos, nas mesmas condições utilizadas neste trabalho, será considerada como proposta de continuidade, principalmente devido à obtenção de uma placa de aquisição de imagens que permitirá uma taxa de amostragem de até 30 quadros/s.

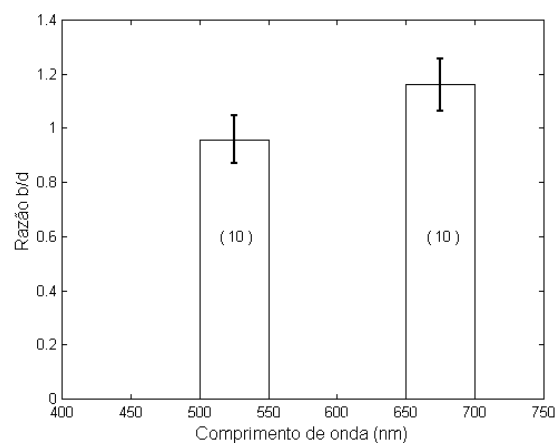


Figura V.7 - Razões médias, com os respectivos intervalos de confiança para a média (distribuição t, de Student, $P = 0,005$), entre os picos **b** e **d** de um total de 20 ondas de DA em retina de ave. Os números entre parênteses referem-se às quantidades de ondas para cada comprimento de onda. (Adaptada de DUARTE, 2000)

V.4 - COMPRIMENTO LONGITUDINAL DOS PICOS DO SINAL ÓPTICO INTRÍNSECO

Como descrito na seção III.2.7, a seqüência temporal do espalhamento de luz divide-se em eventos classificados como picos **b**, **c** e **d**. Segundo a literatura, esses eventos estariam associados a mecanismos de transporte transmembrânicos distintos (MARTINS-FERREIRA e OLIVEIRA CASTRO, 1966). O primeiro pico (**b**) relaciona-se mais com a movimentação iônica e é pouco afetado pela temperatura ou agentes químicos. O segundo pico (**d**) estaria relacionado com os processos metabólicos do tecido, sendo fortemente afetado pela temperatura e agentes químicos. Sendo assim, o

primeiro pico poderia estar correlacionado com a gênese do fenômeno estando, de certa forma, associado à excitabilidade do tecido.

A determinação do comprimento longitudinal representa o espaço ocupado, por cada evento, durante sua ocorrência. O comprimento longitudinal foi determinado a partir da seqüência temporal obtida da ETEL. A análise da variação dos comprimentos dos picos **c** e **d** não será feita por falta de referências experimentais nossas e da literatura, como também de informações decorrentes de simulação matemática, que possibilitem uma base fisiológica consistente para os fenômenos metabólicos e morfológicos que ocorrem durante a onda de DA nas condições deste texto.

O efeito da concentração de NaCl sobre o comprimento da frente de onda está apresentado na figura V.8, onde os valores médios dos comprimentos são normalizados em relação àquele da solução normal. Este gráfico reproduz os dados normalizados da coluna **S_b**, mostrada na tabela IV.5. O gráfico mostra que o comprimento longitudinal do pico **b** aumenta com a redução da concentração de NaCl na solução nutriente. Essa mesma tendência foi observada para a velocidade de propagação da onda (figura V.3). Esses resultados sugerem que, para um mesmo intervalo de tempo, a frente de onda ocupa um espaço maior, resultando em uma velocidade de propagação mais elevada.

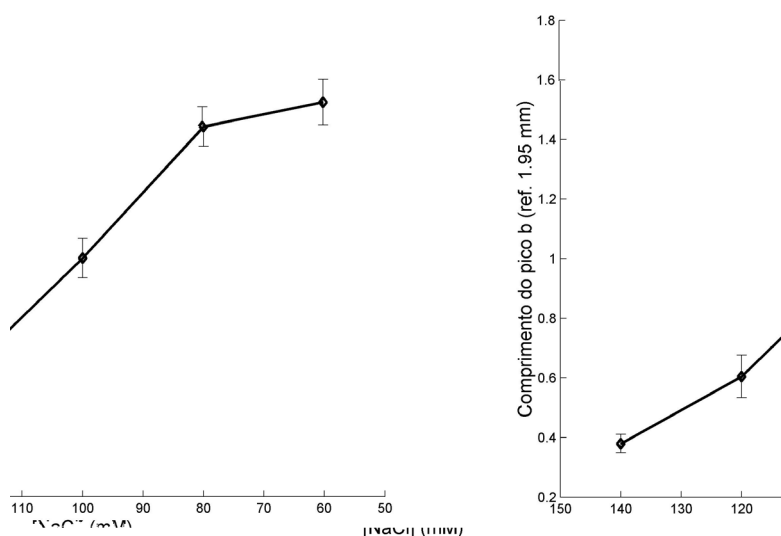


Figura V.8 - Efeito da concentração de NaCl na solução nutriente sobre o comprimento longitudinal da frente de onda, pico **b**. Abscissa: concentração de NaCl. Ordenada: comprimento longitudinal da frente de onda em relação àquele obtido em solução de composição normal.

Os efeitos da variação de NaCl sobre a velocidade de propagação e o comprimento longitudinal da frente de onda foram reunidos na tabela V.1 com registros relativos a um mesmo conjunto de dados. Graficamente, observa-se que as duas grandezas apresentam um comportamento proporcional entre si. Essa relação está apresentada na figura V.9. O fator comum nessa relação é a redução da concentração de NaCl ou, especificamente, a redução da concentração do íon cloreto (MARROCOS e MARTINS-FERREIRA, 1990; TEIXEIRA, 2000).

Tabela V.1 - Variações do comprimento longitudinal da frente de onda em função da velocidade de propagação da reação para as soluções de diferentes concentrações. Os dados estão na forma de média \pm DP (desvio padrão). O número de ondas está representado por N. Temperatura das soluções: $29,2 \pm 0,2$ °C.

[NaCl] (mM)	Comprimento Longitudinal da Frente de Onda (mm)	Velocidade (mm/min)	N
140	$0,73 \pm 0,05$	$2,47 \pm 0,71$	4
120	$1,18 \pm 0,14$	$2,80 \pm 0,41$	6
100	$1,97 \pm 0,13$	$3,28 \pm 0,05$	6
80	$2,81 \pm 0,13$	$4,74 \pm 0,78$	5
60	$2,97 \pm 0,15$	$5,07 \pm 0,30$	5

Uma simulação da propagação da onda de DA foi feita por TEIXEIRA (2000) em função da variação da concentração de Cl⁻. A velocidade e o comprimento longitudinal foram relacionados em um gráfico XY e estão apresentados na figura V.10. Observa-se que a relação entre o comprimento longitudinal e a velocidade é similar aos dados experimentais apresentados na figura V.9. Pode-se inferir que a redução da concentração do íon cloreto causa, em regiões cada vez mais adiante da frente de onda, despolarizações mais acentuadas, o que facilita a deflagração e a propagação do fenômeno, resultando no aumento da velocidade de propagação.

O aumento no espaço ocupado pela frente de onda pode ser visualizado justapondo janelas de amostragem da IPL, oriundas das respectivas ETEL e com escalas espaciais equivalentes, em função da variação da concentração de NaCl. A justaposição dessas janelas forma uma imagem única. A figura V.11 é um exemplo deste tipo de imagem. Esta figura foi composta de janelas de 30 linhas por 3054 colunas (3,5 mm) relativas a IPL de ondas obtidas com concentrações de NaCl desde 140 até 60 mM.

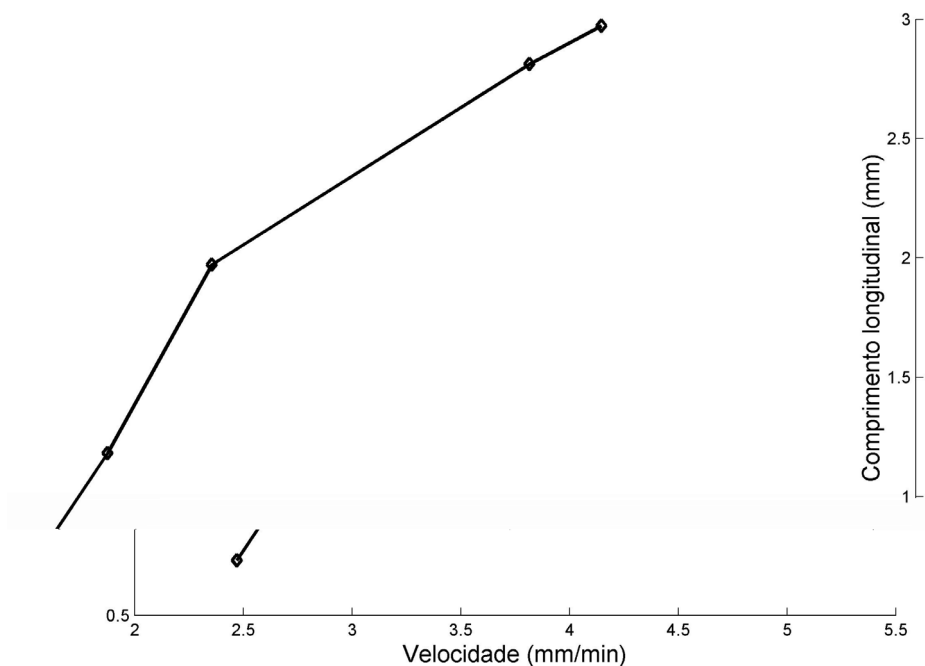


Figura V.9 - Resultados experimentais da variação do comprimento longitudinal da frente da onda de DA em função da velocidade de propagação da reação. Abscissa: velocidade de propagação da onda. Ordenada: comprimento longitudinal da frente de onda. Pode-se observar que o comprimento aumenta à medida que a velocidade aumenta.

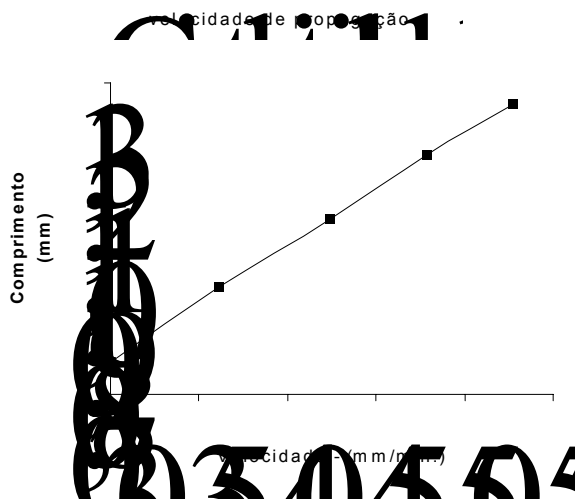


Figura V.10 - Resultados de simulação computacional da onda de DA. Efeito da variação da concentração de Cl^- no meio extracelular sobre o comprimento longitudinal da frente de onda e a velocidade de propagação da onda. (Adaptada de TEIXEIRA, 2000)

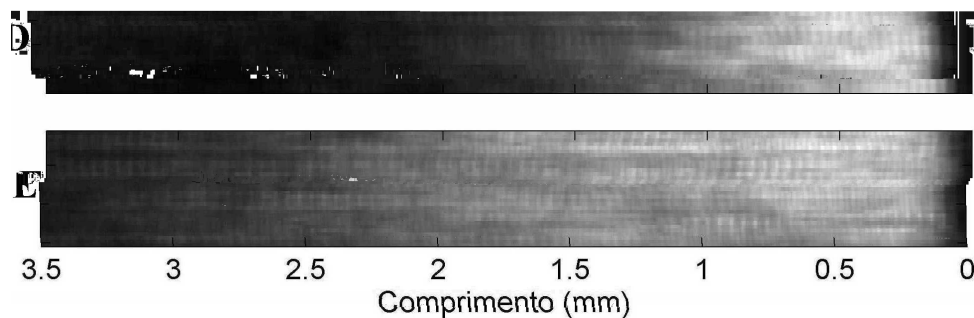


Figura V.11 - Registros do comprimento longitudinal da frente de onda de DA para as diferentes condições de composição iônica extracelular em relação à solução nutriente normal (C). As concentrações de NaCl na solução nutriente e as velocidades de propagação da onda de DA são: (A) 140 mM e 2,90 mm/min; (B) 120 mM e 3,47 mm/min; (C) 100 mM e 3,75 mm/min; (D) 80 mM e 4,54 mm/min; (E) 60 mM e 5,41 mm/min. Pode-se observar um aumento do comprimento à medida em que a osmolaridade do meio extracelular reduz e a velocidade de propagação da onda aumenta.

Dos resultados experimentais e de simulação infere-se que o aumento da velocidade na frente de onda está relacionado com a movimentação iônica. A figura V.11 mostra que há um aumento no espalhamento de luz, relativo à frente de onda, à medida que a velocidade aumenta. Como o espalhamento de luz está associado com índices de refração dos meios extra e intracelulares e esses relacionados com as respectivas osmolaridades, então é razoável considerar que a frente de onda, intimamente associada com movimentação iônica, ocupa um espaço maior com a redução da concentração de NaCl. Se a recuperação dos gradientes iônicos fica mais lenta com o aumento da velocidade, então podemos associar esse comportamento

fisiológico com uma redução da eficiência dos mecanismos de transporte responsáveis por essa recuperação.

TEIXEIRA (2000) associa, através de resultados de simulação computacional, esta redução da eficiência dos mecanismos de transporte com despolarização da membrana representada por um aumento do potencial transmembrânico. Assim sendo, a redução da concentração do íon cloreto no meio extracelular implica em despolarizações de regiões remotas à frente de onda. Se a despolarização aumenta a probabilidade de abertura de um número maior de canais iônicos à frente de onda, é razoável supor que o aumento da velocidade de propagação é uma consequência desse efeito.

Esse efeito pôde ser verificado também no estudo das alterações sobre o comprimento longitudinal do potencial DC dependentes da variação da concentração de NaCl. Os dados experimentais mostram que, com a redução progressiva da concentração do íon cloreto, o comprimento do pico do potencial ocupa um espaço maior. Esse comportamento foi observado através da figura IV.11. Nota-se que tanto o comprimento do pico **b** do sinal óptico quanto o comprimento do potencial DC apresentam comportamentos idênticos. Sendo assim, parece que existe uma causa comum para essas duas grandezas. A forte movimentação iônica à frente do fenômeno parece refletir tanto sobre a dinâmica inicial do pico **b** do sinal óptico quanto sobre aquela do potencial extracelular.

Portanto, infere-se que concomitante ao efeito da despolarização, a redução do íon cloreto no espaço extracelular parece reduzir consideravelmente a atuação dos mecanismos secundários de transporte transmembrânicos (co-transporte). O mecanismo secundário de transporte mais comum em neurônio é o co-transporte potássio-cloreto. Nas glias, o mecanismo mais comum é o co-transporte de sódio-potássio-cloreto. Esses mecanismos são sensíveis aos gradientes de concentração de seus respectivos íons. Ao reduzir a concentração do íon cloreto no meio extracelular, a eficiência da recuperação dos gradientes iônicos também fica reduzida. Assim, esses dois mecanismos de co-transporte parecem ter suas atuações limitadas para a recuperação do potássio intracelular. Isso significa que os gradientes iônicos, após a passagem da frente de onda, levam mais tempo para serem recuperados. Portanto, é provável que as regiões

adjacentes e imediatamente localizadas após a passagem da frente de onda, continuam despolarizadas pela presença do potássio no meio extracelular, o que favoreceu a permanência de alterações no potencial DC em um espaço maior do tecido.

V.5 - POTENCIAL EXTRACELULAR

O potencial extracelular, uma das características principais da onda de DA, é predominantemente negativo, possui variação lenta e reversível, e teve o perfil definido ao longo das camadas da retina por DO CARMO e MARTINS-FERREIRA (1984). Os autores identificaram o centro da IPL como a região onde o potencial DC tem amplitude máxima, como mostrado na figura II.5.

A figura V.12 apresenta registros de potenciais extracelulares na escala temporal durante a onda de DA em soluções de osmolaridades distintas, após o equilíbrio osmótico ter sido atingido. O valor médio para o posicionamento da ponta do microeletrodo de registro do potencial foi de 53% da IPL. Os registros estão representados pelos gráficos **A**, **B**, **C**, **D** e **E**. O gráfico **A** corresponde à solução nutriente de composição normal, **B** e **C** às soluções hipotônicas e **D** e **E** às hipertônicas, cujas concentrações de NaCl são, em mM, 100, 80, 60, 120 e 140, respectivamente. Pode-se observar que em relação à solução normal, à medida que a concentração de NaCl reduz, como indicado nos gráficos **B** e **C**, há um aumento na amplitude do potencial extracelular. Os gráficos **D** e **E** destacam o efeito do aumento na osmolaridade do meio extracelular sobre a amplitude do potencial em relação ao registro **A**. Pode-se notar que o aumento da concentração de NaCl na solução nutriente reduz consideravelmente o potencial DC.

Esta variação do potencial com a concentração de NaCl parece se manter em outros tecidos e condições experimentais. KUME-KICK (2002) estudaram fração de volume e tortuosidade durante desafio osmótico. Esses pesquisadores registraram a influência da variação do NaCl no meio extracelular sobre a transmissão sináptica em neocórtex de rato. A figura V.13 mostra os dados obtidos por eles. Observa-se na figura V.13A que, para condições hipotônicas, a negatividade do potencial aumentou a

partir de uma redução na osmolalidade da solução. Os pesquisadores consideram que esse aumento no potencial se deve à redução do espaço extracelular que leva a um aumento da resistividade. A figura V.13B mostra seus resultados para uma seqüência de soluções hipertônicas. Com o aumento da concentração, os potenciais reduzem sua amplitude. Eles consideram que esta redução foi provavelmente causada pelo aumento do volume do espaço extracelular e pela redução da excitabilidade do tecido. Esses pesquisadores analisaram a reversibilidade do fenômeno, perfundindo o tecido com solução normal ao final de cada tipo de desafio osmótico, verificando que as respostas de potencial eram similares àquelas obtidas nos registros de controle (topo da figura V.13).

A despeito da variação da impedância elétrica em retina apresentar alterações na presença de ondas de DA e ainda sob alterações na osmolaridade do meio de imersão (KUME-KICK, 2002; FERREIRA-FILHO e MARTINS-FERREIRA, 1982), a análise da variação de sua intensidade é muito complexa e os presentes dados experimentais não permitem assunções a este respeito. No entanto, MARTINS-FERREIRA (2000) e TEIXEIRA (2000) sugerem a existência de dois mecanismos para a geração do potencial extracelular negativo que acompanha a onda de DA. O primeiro se refere a correntes circulantes passando através de células gliais, que são localmente despolarizadas pela liberação maciça do íon potássio que ocorre à frente de onda. O segundo, e não menos importante, é aquele referente ao potencial de Nernst desenvolvido diretamente através do espaço extracelular sem correntes circulantes. Esse potencial se desenvolveria a partir do gradiente iônico que se forma entre duas regiões, sendo uma com concentração maior (região invadida pela onda de DA) e outra mais distante, com concentração inferior. O gradiente iônico principal estaria relacionado com o íon potássio e a barreira natural (macro membrana) seria predominantemente criada pela redução do volume do espaço extracelular. Mesmo que esses dois mecanismos coexistam e atuem simultaneamente, ambos são dependentes das fortes movimentações iônicas existentes à frente de onda e da concentração iônica após a passagem da frente de onda. Assim sendo, se os mecanismos de co-transporte de células gliais e neurônios são afetados em meio hipotônico é de se esperar que uma área maior do tecido em torno da frente de onda fique submetida a uma maior variação de concentração iônica. Dessa forma, e baseados nos presentes resultados experimentais, tanto o comprimento do pico **b** (espalhamento de luz correspondente) quanto o

comprimento do potencial extracelular estariam de acordo com esta hipótese e seriam aumentados com a redução da concentração de NaCl. Analogamente, eles seriam reduzidos com o aumento da concentração de NaCl.

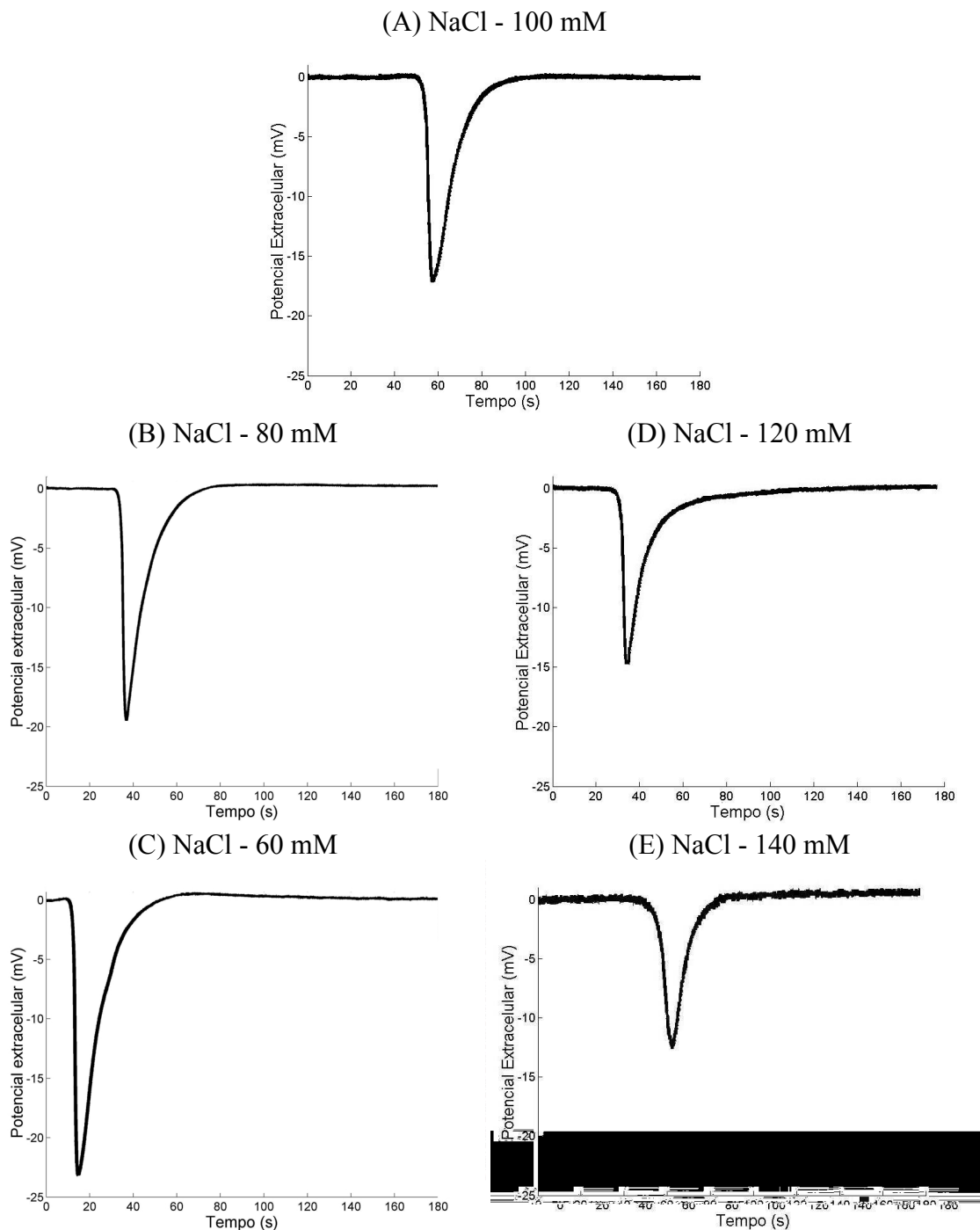


Figura V.12 - Registros de potenciais extracelulares medidos durante a onda de DA em retina de ave imersa em soluções, cujas concentrações de NaCl (mM) e potenciais (mV) são, respectivamente: **A:** 100 e 17,14. **B:** 80 e 19,60. **C:** 60 e 23,34. **D:** 120 e 14,95. **E:** 140 e 12,62. Observa-se que a amplitude do potencial extracelular reduz com o aumento na concentração de NaCl na solução de imersão da retina.

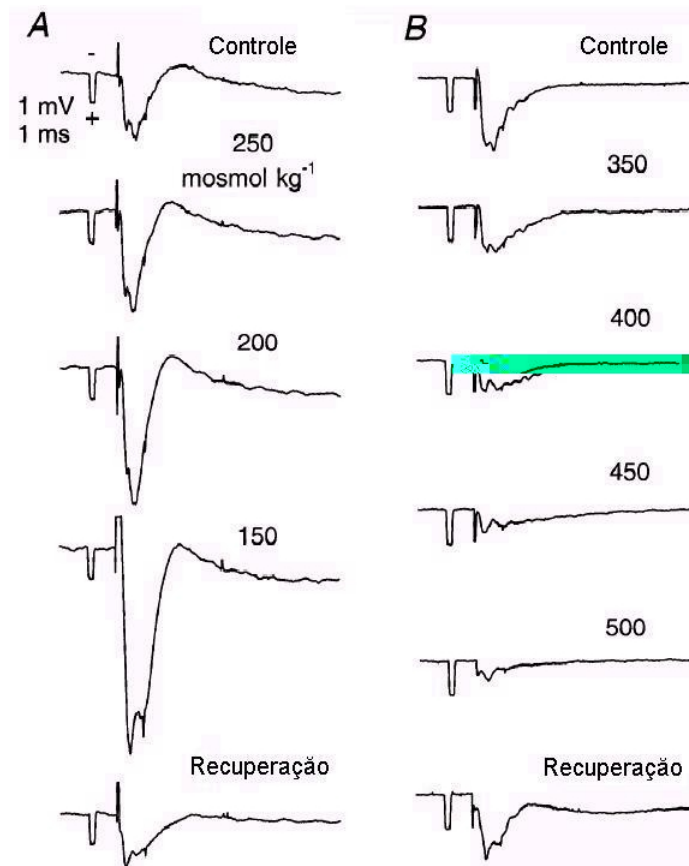


Figura V.13 - Potenciais registrados em neocórtex de rato com concentrações de NaCl diferentes, em mosmol. **A**: séries hipotônicas. Observa-se um grande aumento na negatividade dos potenciais com a redução da osmolalidade. **B**: séries hipertônicas. Pode-se notar uma redução na negatividade dos potenciais com o aumento da osmolalidade. (Adaptada de KUME-KICK, 2002)

V.6 - ESPESSURA DA CAMADA PLEXIFORME INTERNA

OLIVEIRA CASTRO e MARTINS-FERREIRA (1970) verificaram uma relação entre o sinal óptico e a variação da espessura da IPL. Os autores estudaram variações do volume e da espessura da retina de ave durante a passagem da onda de DA e mostraram a concomitância destas com a reação, fora do equilíbrio osmótico. Segundo eles, as alterações na geometria do tecido estão relacionadas com a osmolaridade do meio extracelular, independente da presença da onda de DA, de modo que, por exemplo, o aumento da osmolaridade causa uma redução na espessura do tecido. Além disso, para os autores estas variações na espessura são, provavelmente, resultantes da movimentação de água entre os meios intra e extracelulares. Baseando-se nessa

hipótese, pode-se considerar que o equilíbrio osmótico foi atingido se houve uma estabilidade na espessura da retina após o tempo inicialmente estimado de 1,5 h da perfusão das soluções.

Para tanto, as variações da espessura da retina foram medidas em todas as ondas no intuito de se observar o equilíbrio osmótico. Os valores médios das espessuras da IPL foram agrupados relativamente a cada concentração de NaCl. Em meio hipertônico, a espessura da IPL se estabilizou em um valor ligeiramente inferior à espessura da condição normal. Em meio hipotônico, a espessura da IPL estabilizou em um valor ligeiramente superior à condição normal. Considera-se, então, que os experimentos foram realizados, dessa forma, em equilíbrio osmótico. Os resultados mostraram que os mecanismos identificados como RVD () atuaram e levaram a espessura a um valor ligeiramente superior ao normal. Similarmente, os mecanismos identificados como RVI () atuaram e a espessura da IPL se estabilizou em um valor ligeiramente inferior ao normal. Essa característica também foi comprovada por WEISS (1996) em outro tipo de tecido.

V.7 - PROPOSTAS DE CONTINUIDADE

Como propostas de continuidade deste trabalho, utilizando-se a montagem experimental descrita por DUARTE (2000) e as técnicas computacionais descritas por DUARTE (2003), sugere-se a realização de experimentos, referentes ao estudo do espalhamento de luz associado a sinais eletrofisiológicos, tais como:

- :
realização de experimentos, nas condições utilizadas neste trabalho, com o uso de uma placa de aquisição de imagens que permita uma taxa de amostragem de até 30 quadros/s, e um amplificador específico para medidas extracelulares (pré-amplificador acoplado diretamente na micropipeta) compatível com o amplificador existente. Acredita-se que, com a utilização da placa de aquisição de alto desempenho, o sinal óptico apresentará um nível de ruído bem inferior ao apresentado pela placa utilizada nesse trabalho. A redução do ruído poderá

implicar em uma variabilidade menor do sinal óptico para cada condição de osmolaridade do meio extracelular. O nível de ruído do sinal óptico é dependente da taxa de amostragem das imagens digitalizadas. Quanto maior for a taxa de amostragem, menor será o nível do ruído. A utilização do pré-amplificador específico (), como por exemplo o denominado Excelp da WPI, permitirá um controle melhor sobre os ruídos do do sinal elétrico uma vez que se trata de um amplificador blindado com cabos apropriados. Além disso, a simulação computacional da onda de DA, em condições similares às experimentais, será feita para toda a evolução temporal e espacial do sinais óptico e elétrico, o que permitirá interpretações difíceis de serem feitas apenas com os resultados experimentais.

- : a literatura apresenta registros dos sinais ópticos, do potencial extracelular e da variação dos principais íons envolvidos no fenômeno da depressão alastrante. Acredita-se que, com a utilização da mesma montagem experimental e eletrodos íon-seletivos o estudo da sincronização desses sinais possa trazer mais informações sobre a origem da onda de DA e sua dinâmica em tecidos neurais.
- : no decorrer dos experimentos realizados, foram observadas oscilações, imediatamente à frente de onda de DA, que não foram detectadas pela construção da ETEL. A identificação dessas oscilações pode fornecer maiores informações sobre a deflagração e propagação da onda de DA. Os registros desse sinal levarão ao estudo da gênese do fenômeno em regiões à frente de onda de DA. Os resultados poderão indicar as seqüências temporal e espacial do sinal óptico à frente de onda, podendo fornecer indícios ainda obscuros sobre a origem desse fenômeno.
- : este estudo deverá identificar as dependências espaço temporais de atividade iônica durante a onda de DA através de sondas ópticas fluorescentes. A análise dos resultados experimentais deverá ser feita simultaneamente com os resultados de simulação. Um programa computacional deverá ser desenvolvido

para simulação da onda de DA em retina. O estudo desta associação dos resultados experimentais e de simulação poderá suscitar outras discussões no intuito de se melhor entender a natureza do fenômeno da depressão alastrante.

CAPÍTULO VI - CONCLUSÃO

O desenvolvimento deste trabalho foi inspirado em um dos temas propostos em DUARTE (2000) para a utilização de uma nova abordagem para o estudo da depressão alastrante em retinas de aves. O trabalho se restringiu ao estudo dos efeitos causados pela variação da concentração de NaCl na composição da solução nutriente sobre parâmetros cinéticos da onda de DA caracterizada pelos sinais óptico e elétrico.

A montagem experimental e a técnica de medição do sinal óptico desenvolvidas na UFSJ (DUARTE, 2000) confirmaram a potencialidade da técnica de medida do sinal óptico por luz ortogonalmente espalhada, o que permitiu a obtenção de vários parâmetros da onda de DA em ambiente único. Os procedimentos computacionais registrados em DUARTE (2000), como por exemplo aquele relativo à estimativa da velocidade de propagação da onda de DA, foram aperfeiçoados e outros novos foram desenvolvidos nesse trabalho, como aqueles relativos aos comprimentos espaciais de trechos do sinal óptico entre outros.

Alguns resultados obtidos neste trabalho foram compatíveis com outros existentes na literatura como, por exemplo, alterações na amplitude e espaço ocupado pela frente de onda do sinal óptico, velocidade de propagação da onda. Outros não encontraram similares na literatura, apesar da extensa pesquisa bibliográfica, como, por exemplo, variação da espessura da IPL, da amplitude e do comprimento do potencial extracelular em função da concentração de NaCl, e do comprimento dos picos **c** e **d** do sinal óptico.

Os dados relativos ao sinal óptico que puderam ser comparados com a literatura não apresentaram discrepâncias significativas pela condição experimental de equilíbrio osmótico. A velocidade de propagação, a relação entre os picos **b** e **d** e o comprimento da frente de onda apresentaram comportamentos e tendências similares na literatura. As similaridades existiram mesmo considerando as diferenças nas condições experimentais. Ao que parece, a única distinção clara foi aquela relacionada com a intensidade da linha de base do sinal óptico. Fora do equilíbrio e em meio hipertônico, a retina fica mais

opaca implicando em luz retro-espalhada de maior intensidade. Em meio hipotônico e fora do equilíbrio, a retina fica mais transparente resultando em redução da intensidade da linha de base. Após o equilíbrio osmótico ter sido atingido, a intensidade da linha de base e a evolução do sinal óptico apresentaram comportamentos semelhantes àquele da condição normal.

No entanto, ao longo da evolução da onda de DA, alterações significativas no sinal óptico não foram observadas. As similaridades do sinal óptico no equilíbrio ou fora dele podem significar que, uma vez deflagrado o fenômeno, o estado funcional do tecido, durante o evento, modulam o espalhamento de luz. Considerando que esse espalhamento é modulado pelos índices de refração relativo e geometria do tecido (DUARTE, 2000), pode-se supor que estes parâmetros oscilam dentro de faixas de variação similares, independente da condição de equilíbrio osmótico. Se é verdade, o sinal óptico não apresentaria mudança significativa em sua dinâmica, mesmo nas condições experimentais apresentadas. Esta hipótese não pode ser confirmada pelos resultados deste trabalho, mas essa inferência se baseia nos dados dos vários trabalhos desenvolvidos e em desenvolvimento dentro dessa linha de pesquisa ao longo dos últimos anos. Acredita-se que a associação dos resultados apresentados aqui com o de outros trabalhos mais a implementação da proposta de continuidade relativa à simulação da onda de DA, em condições de osmolaridade variável, possam esclarecer esse ponto.

Os dados apresentados neste trabalho indicaram que as alterações existentes no sinal óptico são dependentes de variações de fluxos iônicos e conseqüentemente do volume do espaço extracelular além do comprimento de onda da luz incidente. Outra contribuição foi corroborar a hipótese, existente na literatura, de que mecanismos distintos controlam períodos particulares e diferentes da seqüência da onda de DA representada pelo sinal óptico.

Espera-se que os resultados apresentados e aqueles resultantes da continuidade desse trabalho possam gerar volume de dados que, se correlacionados com enfoque adequado, contribuam para o esclarecimento dos mecanismos básicos que controlam a gênese e a seqüência do fenômeno da depressão alastrante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BURES, J., BURESOVÁ, O., KRIVÁNEK J., 1974, “The Mechanism and Applications of Leão’s Spreading Depression of Electroencephalographic Activity”,
- DO CARMO, R. J., MARTINS-FERREIRA, H., 1984, “Spreading Depression of Leão Probed with Ion-Selective Microelectrodes in Isolated Chick Retina”,
 , v. 56, n. 4, pp. 401-421.
- DO CARMO, R. J., 1987, “Depressão Alastrante”,
 , v. 7, n. 37, pp. 26-32.
- DUARTE, M. A., 2000, “
 ”, Tese de D.Sc., UNICAMP,
 Departamento de Engenharia Biomédica, Campinas, SP, Brasil.
- DUARTE, M. A., ALMEIDA, A. C. G., INFANTOSI, A. F. C., BASSANI, J. W. N.,
 2003, “Functional Imaging of the Retinal Layers by Laser Scattering: an Approach for the Study of Leão’s Spreading Depression in Intact Tissue”,
 , v. 123, pp. 139-151.
- FERREIRA-FILHO, C.R., MARTINS-FERREIRA, H., 1982, “Electrical Impedance of Isolated Retina and its Changes During Spreading Depression”,
 , v. 7,
 pp. 3231-3239.
- GONZALEZ, R. C., WOODS, R. E., 1993,
 , Massachusetts,
 Addison-Wesley.
- GOURAS, P., 1958, “Spreading Depression of Activity in Amphibian Retina”,
 , v. 195, pp. 28-32.
- GRAFSTEIN, B., 1956, “Mechanism of Spreading Cortical Depression”,
 , v. 19, pp. 154-171.

- HOLTHOFF, K., WITTE, O. W., 1996, "Intrinsic Optical Signals in Rat Neocortical Slices Measured with Near-Infrared Dark-Field Microscopy Reveal Changes in Extracellular Space", *Journal of Neurophysiology*, v. 16, n. 8, pp. 2740-2749.
- HOLTHOFF, K., WITTE, O. W., 1997, "Recording of Neuronal Network Properties with Near-Infrared Dark-Field Microscopy and Microelectrodes", *Journal of Neurophysiology*, v. 42, n. 20-22, pp. 3241-3246.
- HOLTHOFF, K., WITTE, O. W., 1998, "Intrinsic Optical Signals : A Tool to Measure Alterations in Extracellular Space with Two-Dimensional Resolution", *Journal of Neurophysiology*, v. 47, n. 6, pp. 649-655.
- KRIZAJ, D., RICE, M. E., WARDLE, R. A., NICHOLSON, C., 1996, "Water Compartmentalization and Extracellular Tortuosity after Osmotic Changes in Cerebellum of *Rattus norvegicus*", *Journal of Neurophysiology*, v. 49, n. 3, pp. 887-896.
- KUFFLER, S. W., NICHOLLS, J. G., ORKAND, R. K., 1966, "Physiological Properties of Glial Cells in the Central Nervous System of Amphibia", *Journal of Neurophysiology*, v. 29, pp. 768-787.
- KUME-KICK, J., MAZEL, T., VORISEK, S. H., HRABETOVA, S., TAO, L., NICHOLSON, C., 2002, "Independence of Extracellular Tortuosity and Volume Fraction during Osmotic Challenge in Rat Neocortex", *Journal of Neurophysiology*, v. 54, n. 2, pp. 515-527.
- LADEWIG, T., HANKE, W., GOLDBERGMANN, M., ALMEIDA, A. C. G., LIMA, V. M. F., 1998, "Distribution of Gap Junctions in the Chicken Retina", *Journal of Neurophysiology*, v. 39, pp. 77-86.
- LEÃO, A. A. P., 1944, "Spreading Depression of Activity in the Cerebral Cortex", *Journal of Neurophysiology*, v. 7, pp. 331-339.
- LEÃO, A. A. P., 1947, "Further Observations on the Spreading Depression of Activity in the Cerebral Cortex", *Journal of Neurophysiology*, v. 10, pp. 409-414.

- LEÃO, A. A. P., 1972, "Spreading Depression". In: Purpura, D. P. (eds), , 1 ed., chapter 7, New York, Raven Press.
- LEÃO, A. A. P., MARTINS-FERREIRA, H., 1953, "Alteração da Impedância Elétrica no Decurso da Depressão Alastrante da Atividade do Córtex Cerebral", , v. 25, pp. 259-266.
- LEÃO, A. A. P., 1963, "On the Spread of Spreading Depression", , Los Angeles, University of California, v. 1, pp. 73-85.
- LUX, H. D., HEINEMANN, U., DIETZEL, I., 1986, "Ionic Changes and Alterations in the Size of the Extracellular Space During Epileptic Activity". In: Delgado-Escueta, A. V. (eds), , v. 44, chapter 31, New York, Raven Press.
- MACVICAR, B. A., HOCHMAN, D., 1991, "Imaging of Synaptically Evoked Intrinsic Optical Signals in Hippocampal Slices", , v. 11, pp. 1458-1469.
- MARROCOS, M. A., MARTINS-FERREIRA, H., 1990, "Effect of Na⁺ and Cl⁻ on the Velocity of Propagation of the Spreading Depression in Chick retina", , v. 23, pp. 473-476.
- MARTINS-FERREIRA, H., OLIVEIRA CASTRO, G., 1966, "Light-Scattering Changes Accompanying Spreading Depression in Isolated Retina", v. 29, pp. 715-726.
- MARTINS-FERREIRA, H., OLIVEIRA CASTRO, G., STRUCHINER, C. Y., RODRIGUES, P. S., 1974, "Circling Spreading Depression in Isolated Chick Retina", , v. 37, pp. 773-784.
- MARTINS-FERREIRA, H., 1983, "Spreading Depression in the Chicken Retina". In: T. OOKAWA (ed), , Tokyo, Japan Scientific Societies Press, pp. 317-333.

- MARTINS-FERREIRA, H., 1993, "Propagation of Spreading Depression in Isolated Retina". In: A. LEHMENKÜHLER, K. H. GROTEMEYER, F. TEGTMEIER (eds.), _____, Munich, Urban and Schwartzberg, Germany, pp. 533-546.
- MARTINS-FERREIRA, H., 1994, "Spreading Depression: a Neurohumoral Reaction", _____, v. 27, pp. 851-863.
- MARTINS-FERREIRA, H., NEDERGAARD, M., NICHOLSON, C., 2000, "Perspectives on Spreading Depression", _____, v. 32, pp. 215-234.
- MILNER, P. M., 1958, "Note on a Possible Correspondence between the Scotomas of Migraine and Spreading Depression of Leão", _____, v. 10, pp. 705.
- NEWMAN, E. A., 1989, "Electrophysiology of Retinal Glial Cells", _____, v. 8, pp. 153-171.
- OLIVEIRA CASTRO, G., MARTINS-FERREIRA, H., 1970, "Deformations and Thickness Variations Accompanying Spreading Depression in the Retina", _____, v. 33, pp. 891-900.
- OLIVEIRA CASTRO, G., MARTINS-FERREIRA, H., GARDINO, P. F., 1985, "Dual Nature of the Peaks of Light Scattered During Spreading Depression in the Chick Retina", _____, v. 57, n. 1, pp. 97-103.
- ORKAND, R. K., NICHOLLS, J. G., KUFFLER, S. W., 1966, "The effect of Nerve Impulses on the Membrane Potential of Glial Cells in the Central Nervous System of Amphibia", _____, v. 29, pp. 788-806.

- SILVA, S. F., 2000, “
”, Dissertação
de M. Sc., COPPE/UFRJ, Programa de Engenharia Biomédica, Rio de Janeiro, RJ,
Brasil.
- STEPNOSKI, R. A., LAPORTA, A., RACCUIA-BEHLING, F., BLONDER, G. E.,
SLUSHER, R. E., KLEINFELD, D., 1991, “Noninvasive Detection of Changes in
Membrane Potential in Cultured Neurons by Light Scattering”,
, v. 88, pp. 9382-9386.
- STREIT, D. S., FERREIRA-FILHO, C. R., MARTINS-FERREIRA, H., 1995,
“Spreading Depression in Isolated Spinal Cord”, , v. 74, n. 2, pp.
888-890.
- TEIXEIRA, H. Z., 2000, “
”, Dissertação de M.Sc., COPPE/UFRJ, Programa
de Engenharia Biomédica, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- TEIXEIRA, H. Z., ALMEIDA, A. C. G., INFANTOSI, A. F. C., RODRIGUES, A. M.,
DUARTE, M. A., 2001, “Descrição Matemática da Dinâmica Iônica em Tecidos
Neuronais”, , v. 17, n. 2, pp. 85-96.
- VAN HARREVELD, A., KHATTAB, F. I., 1967, “Changes in Cortical Extracellular
Space During Spreading Depression Investigated with the Electron Microscope”,
, v. 30, pp. 911-929.
- VILLRINGER, A., CHANCE, B., 1997, “Non-Invasive Optical Spectroscopy and
Imaging of Human Brain Function”, , v. 20, pp. 435-442.
- WALZ, W., 2000, “Role of Astrocytes in the Clearance of Excess Extracellular
Potassium”, , v. 36, pp. 291-300.
- WEISS, T. F., 1996. , 1 ed., v. 1: Transport, Cambridge,
Massachusetts, MIT Press.

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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