

FERNANDO ALLAN DE FARIAS ROCHA

**ESTUDO DO PROCESSAMENTO CROMÁTICO EM CÉLULAS
AMÁCRINAS E GANGLIONARES NA RETINA DA TARTARUGA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular (Área de Concentração Neurociências), Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Dora Fix Ventura

Belém
2007

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Rocha, Fernando Allan de Farias
ESTUDO DO PROCESSAMENTO CROMÁTICO EM CÉLULAS AMÁCRINAS E
GANGLIONARES NA RETINA DA TARTARUGA.
Belém, Pará, UFPA / CCB, 2007.

xx, 113f

Tese: Doutor em Ciências (Neurociências)

1. Oponência cromática. 2. Células ganglionares. 3. Registro eletrofisiológico intracelular. 4. *Trachemys scripta elegans*. 5. Espaço de cor. I. Universidade Federal do Pará / Centro de Ciências Biológicas. II. Título.

*Este trabalho é inteiramente
dedicado a minha família.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Profa. Dora Fix Ventura pela sua valiosa orientação, assim como pelo seu esforço para proporcionar toda a infra-estrutura necessária para a realização do projeto.

Ao Prof. John de Souza pela atenção e paciência para comigo desde que cheguei ao laboratório, sem dúvidas uma grande pessoa com a qual tive o privilegio de trabalhar.

Ao Prof. Luciano da Fontoura Costa, pesquisador com a qual tive a oportunidade de interagir e ter a percepção de novos horizontes na neurociência.

Agradeço a todos os estimados amigos do laboratório de Psicologia Sensorial, Ana Laura, Claudia, Claudiel, Cristiane, Einat, Elaine, Emília, Marcio, Marcelo, Mirella Barboni, Nestor, Paulo, Renata, Rosani, Silvana, Sonia, e Valtenice, pelos momentos de convivência e confraternização.

Aos amigos André, Bossi, Bruno, Daniela, Julio, Lucy, Mirella, Rose, Saulo, e Soninha, dos quais guardo grandes passagens ocorridas nesses últimos anos.

A todas as pessoas que trabalham no Instituto de Psicologia da USP, muitos dos quais tive a satisfação de conhecer pessoalmente.

Aos professores e amigos do Departamento de Fisiologia do Centro de Ciências Biológicas da UFPA que me apoiaram nesta caminhada.

A Universidade Federal do Pará, eu agradeço pela minha formação acadêmica.

Ao IBAMA, pela doação de parte dos animais experimentais.

A CAPES pelo suporte financeiro.

“Três coisas para mim no mundo valem bem mais do que o resto, pra defender qualquer delas Eu mostro o quanto que presto...”.

é o gesto, é o passo, é o grito,...

O gesto é a voz do proibido escrita sem deixar traço, chama, ordena, empurra, assusta, vai longe com pouco espaço...

O passo começa o vôo que vai do chão para o infinito, pra mim que amo estrada aberta quem prende o passo é um maldito...

O grito explode o protesto se a boca já não dá espaço o que guarda o que há para ser dito...”

Hermeto Pascoal

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Psicofisiologia Sensorial, Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, sob a orientação do Profa. Titular Dora Fix Ventura. Estavam em vigência suportes financeiros concedidos por CAPES-PROCAD Processo nº 0019/01-1, e pela FAPESP (Projeto Temático 02/12733-8). O autor recebeu bolsa de doutorado CAPES/PROCAD e bolsa de doutorado CAPES durante a realização do presente trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE TABELAS	XVII
RESUMO.....	XVIII
ABSTRACT	XX
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O SISTEMA VISUAL DA TARTARUGA.....	5
1.1.1. Neurônios de Primeira Ordem.....	7
1.1.2. Neurônios de Segunda Ordem.....	10
1.2. PROCESSAMENTO CROMÁTICO	17
1.3. OBJETIVOS.....	19
2.1. O ANIMAL	20
2.2. PROCEDIMENTOS ELETROFISIOLÓGICOS.....	20
2.2.1. Preparação do Material Biológico para o Registro Eletrofisiológico.....	20
2.3. EQUIPAMENTO DE REGISTRO	22
2.4. ESTIMULAÇÃO ÓPTICA.....	22
2.5. PROCEDIMENTO GERAL	24
2.6. PARADIGMA DE ESTIMULAÇÃO.....	24
2.7. HISTOLOGIA.....	26
2.8. CLASSIFICAÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DAS CÉLULAS GANGLIONARES.....	27
2.9. CLASSIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DAS CÉLULAS GANGLIONARES.....	27
3. RESULTADOS	28
3.1. OPONÊNCIA CROMÁTICA EM CÉLULAS GANGLIONARES	28
3.1.2. Células Ganglionares com Oponência Cromática UVBG+ R-	36

3.1.3.	Células Ganglionares com Oponência Cromática UV+ BGR-	38
3.1.4.	Células Ganglionares com Oponência Cromática BGR+ UV-	41
3.1.5.	Células Ganglionares com Oponência Cromática GR+ UVB-	43
3.1.6.	Células Ganglionares com Oponência do Tipo UVB+ GR-	48
3.1.7.	Células Ganglionares com Oponências Antagônicas	49
3.1.8.	Célula Ganglionar com Oponência BG+ UVR-	52
3.1.9.	Célula Ganglionar com Oponência UVGR+ B-	54
3.1.10.	Célula Ganglionar com Oponência UVR+BG-	56
3.1.11.	Célula Ganglionar com Oponência UVG+ BR-	58
3.2.	CÉLULAS AMÁCRINAS Oponentes	60
3.2.1.	Célula Amácrina com Oponência Cromática R+ UVBG-	61
3.2.2.	Célula Amácrina com Oponência Cromática RG+ UVB	64
3.2.3.	Célula Amácrina com Oponência Cromática BGR+ UV-	65
3.2.4.	Célula Amácrina com Oponência Cromática UVBG+R-	66
3.3.	CÉLULAS GANGLIONARES SEM Oponência Cromática	71
3.3.1.	Células Ganglionares tipo ON	71
3.3.2.	Célula Ganglionar OFF	79
3.3.3.	Células Ganglionares OFF-ON	83
3.3.4.	Células ganglionares ON-OFF	85
4.	DISCUSSÃO	87
4.1.	CÉLULAS AMÁCRINAS Oponentes	89
4.2.	OPONÊNCIA CROMÁTICA E INTENSIDADE DO ESTÍMULO	92
4.3.	CÉLULAS GANGLIONARES Oponentes	94
4.4.	FUNÇÃO DA VISÃO NO ULTRAVIOLETA	97
4.5.	ESPAÇO DE COR HIPOTÉTICO DE UM SISTEMA TETRACROMATA	98

5. CONCLUSÕES.....	101
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
ANEXO I.....	113

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Evolução de répteis, aves e mamíferos a partir dos ancestrais sauropsides. (A) Árvore filogenética simplificada mostrando a radiação mútua de mamíferos e dinossauros durante o período Mesozóico.....3
- Figura 2. Corte radial da retina da tartaruga corado com Hematoxilina-Eosina, mostrando disposição de todas as camadas celulares e intercelulares. (Figura gentilmente cedida por Sonia Grötzner).....6
- Figura 3. Pares de fotomicrografias da retina da tartaruga visualizadas sob luz transmitida (fileiras 1 e 3).....8
- Figura 4. Diagrama esquemático da morfologia das células fotorreceptoras da tartaruga. Os cones UV (ultravioleta).....9
- Figura 5. Diagrama esquemático da morfologia dos tipos de células bipolares da retina da tartaruga. Nas células desenhadas em uma visão vertical..... 11
- Figura 6. Morfologia e respostas de uma célula bipolar B10. (A) Desenho esquemático da célula bipolar B10 estratificando nas sublâminas s2 e s4. (B) Respostas a estímulos circulares (800 μm de diâmetro) nos comprimentos de onda de 649 nm..... 12
- Figura 7. Morfologia e respostas eletrofisiológicas das células horizontais da retina de *Trachemys s. elegans*. (A) célula horizontal do tipo H1-CC, (B) tipo H1-TA..... 15

- Figura 8. Representação esquemática do protocolo de estimulação utilizado no registro intracelular. (A) Íris, aumento gradual no tamanho do estímulo..... 25
- Figura 9. Registros de duas células ganglionares aos estímulos 370 (UV), 450 (B), 540 (G) e 640 nm (R). (A) Registro da célula T25RC2 obtido a partir da estimulação..... 32
- Figura 10. Registros de duas células ganglionares aos estímulos 370 (UV), 450 (B), 540 (G) e 640 nm (R). (A) Registro da célula T25RC2 obtido a partir da estimulação..... 34
- Figura 11. Registro intracelular e morfologia da célula ganglionar (T47RC4) identificada como G21. (A) Registros obtidos a partir da estimulação da central do campo receptivo com estímulos circulares ($\varnothing = 700 \mu\text{m}$ de diâmetro) nas intensidades de -2 e -1 log.....35
- Figura 12. Registros intracelulares de uma célula ganglionar (T14LC6) aos estímulos 370 (UV), 450 (B), 540 (G) e 640 nm (R), em três níveis de intensidade e diâmetro..... 36
- Figura 13. Registros intracelulares de duas células ganglionares aos estímulos 370 (UV), 450 (B), 540 (G) e 640 nm (R), em diferentes níveis de intensidade e formas do estímulo. (A) registros obtidos na célula (T49RC1) no centro do campo receptivo.....37
- Figura 14. Registros intracelulares de uma célula ganglionar (T27RC5) aos estímulos 370 (UV), 450 (B), 540 (G) e 640 nm (R), em três níveis de intensidades (-3 , -2 , -1 log).....39
- Figura 15. Registros intracelulares de uma célula ganglionare aos estímulos 370 (UV), 450 (B), 540 (B) e 640 nm (R), em diferentes níveis de intensidade e formas do estímulo.....40

Figura 16. Desenho esquemático e registro de uma célula ganglionar (T42LC2) classificada como BGR+UV- aos estímulos 370 (UV), 450 (B), 540 (G) e 640 nm (R).....	42
Figura 17. Registro intracelular uma célula ganglionar (T15RC3) aos estímulos 370 (UV), 450 (azul), 540 (verde) e 640 nm (vermelho).....	43
Figura 18. Morfologia e registros intracelulares da célula ganglionar (T21RC2) aos estímulos 370 (UV), 450 (B), 540 (G) e 640 nm (R). (A) (C) Reconstrução bidimensional.....	45
Figura 19. Registros intracelulares de uma célula ganglionar (T23RC3) aos estímulos 370 (UV), 450 (azul), 540 (verde) e 640 nm (vermelho).....	46
Figura 20. Morfologia e registros intracelulares de uma célula ganglionar (T27RC8) aos estímulos 370 (UV), 450 (B), 540 (G) e 640 nm (R).....	47
Figura 21. Registros intracelulares de uma célula ganglionar (T49RC3) aos estímulos 370 (UV), 450 (B), 540 (G) e 640 nm (R). Registros obtidos da estimulação central.....	48
Figura 22. Registro intracelular da célula ganglionar T40RC1 com dupla oponência cromática. (A) Estímulos centrais ($\emptyset = 700 \mu\text{m}$) promovem respostas R+ UVBG- na maior intensidade (-1 log). (B) Estímulos periféricos ($\emptyset = 1500/1050 \mu\text{m}$).....	49
Figura 23. Respostas de duas células ganglionares com oponências antagônicas (B+ UVGR- versus UVGR+ B-). (A) registros obtidos da estimulação central do campo receptivo.....	51
Figura 24. Registros intracelulares de uma célula ganglionar (T41LC3) aos estímulos 370 (UV), 450 (B), 540 (G) e 640 nm (R). (A) Registros obtidos da estimulação central.....	53

- Figura 25. Registros intracelulares de uma célula ganglionar (T42RC2) com dupla oponência. (A) Registros obtidos da estimulação central do campo receptivo ($\emptyset = 700 \mu\text{m}$) nas intensidades três intensidades. (B) Registros obtidos a partir da estimulação.....55
- Figura 26. Registros intracelulares de uma célula ganglionar (T47LC2). (A) Registros obtidos da estimulação central do campo receptivo ($\emptyset = 300 \mu\text{m}$) nas intensidades.....57
- Figura 27. Registros intracelulares de uma célula ganglionar (T50RC). Registros obtidos da estimulação central do campo receptivo ($\emptyset = 300 \mu\text{m}$) nas intensidades três intensidades.....59
- Figura 28. Registros intracelulares de uma célula amácrina (T05C5) aos estímulos 370 (UV), 450 (B), 540 (G) e 640 nm (R). Registros obtidos da estimulação central do.....62
- Figura 29. Registros intracelulares de uma célula amácrina (T27C10) aos estímulos 370 (UV), 450 (B), 540 (G) e 640 nm (R). Registros obtidos da estimulação central do campo..... 63
- Figura 30. Registros intracelulares de uma célula amácrina (T25C7) aos estímulos 370 (UV), 450 (B), 540 (G) e 640 nm (R). (A) Registros obtidos da estimulação central..... 64
- Figura 31. Registros intracelulares de uma célula amácrina (T21C4) aos estímulos 370 (UV), 450 (B), 540 (B) e 640 nm (R). Registros obtidos da estimulação central do campo..... 66
- Figura 32. Micrografia e registros intracelulares de uma célula amácrina (T27C2) aos estímulos 370 (UV), 450 (B), 540 (G) e 640 nm (R). (A). registros obtidos.....68
- Figura 33. Registros intracelulares de uma célula ganglionar (T32RC3) com dupla oponência. (A) Registros obtidos da estimulação central do campo receptivo ($\emptyset = 700 \mu\text{m}$) nas intensidades três intensidades. (B) Registros obtidos a partir da estimulação.....69

- Figura 34. Desenho esquemático e reconstrução bidimensional de uma célula amácrina (T32RC3). (A) Célula amácrina identificada como A19 com estratificação na sub-lâmina s4 (escala = 50 μm). (B) Na imagem reconstruída podemos notar a célula amácrina..... 70
- Figura 35. Registros intracelulares e a morfologia da célula ganglionar (T47RC2) do tipo ON. (A) Registros obtidos da estimulação central do campo receptivo ($\emptyset = 300 \mu\text{m}$)..... 73
- Figura 36. Desenho e registros intracelulares de uma célula ganglionar (T39RC2) aos estímulos 370 (UV), 450 (B), 540 (G) e 640 nm (R). (A) célula ganglionar.....75
- Figura 37. Registros intracelulares de uma célula ganglionar (T43RC5). (A) Série espectral realizada com círculos de 1500 de diâmetro em passos de 40 nm entre os..... 76
- Figura 38. Registros intracelulares e morfologia de uma célula ganglionar tipo ON (T43RC5). (A) registros obtidos a partir da estimulação central do campo receptivo ($\emptyset = 700 \mu\text{m}$)..... 78
- Figura 39. Registros intracelulares e morfologia de uma célula ganglionar tipo OFF (T42RC3). (A) registros obtidos a partir da estimulação central do campo receptivo..... 80
- Figura 40. Morfologia e registros intracelulares de uma célula ganglionar tipo OFF (T31RC3). (A) Reconstrução bidimensional da célula ganglionar na qual a informação.....82
- Figura 41. Morfologia e registros intracelulares de uma célula ganglionar tipo OFF/ON (T35RC3). (A) Desenho esquemático da célula ganglionar (escala = 100 μm)..... 84
- Figura 42. Registro e morfologia de uma célula ganglionar tipo ON/OFF (T35RC4). (A) Registro da célula obtido a partir da estimulação central do campo receptivo (700 μm).....86

Figura 43. Desenho de duas células classificadas como G21.....	97
Figura 44. Representação gráfica do espaço de cor hipotético da tartaruga.....	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Picos de Sensibilidade espectral das opsinas e das gotículas de óleo da <i>Trachemys scripta elegans</i>	9
Tabela 2. Tipos de Codificação de Cor.	30
Tabela 3. Tipos de Codificação de Cor.	60
Tabela 4. Células registradas e marcadas na retina interna	89
Tabela 5. Compilação das otonências espectrais e tipos morfológicos de amácrinas ganglionares.....	91
Tabela 6. Compilação das otonências espectrais e tipos morfológicos de células ganglionares.	95

RESUMO

A retina da tartaruga é um modelo extensamente utilizado no estudo dos mecanismos neurais de processamento cromático. Oponência de cor foi estudada inicialmente com três estímulos (luzes vermelha, verde e azul). Contudo, estudos comportamentais mostraram que a tartaruga tem um sistema tetracromata com a adição de um fotorreceptor na faixa do ultravioleta (UV). Recentemente nosso laboratório descreveu dados relacionados às propriedades de resposta de células horizontais, bipolares, amácrinas e ganglionares para estímulos na faixa do UV. No presente estudo registramos células amácrinas e ganglionares com oponência cromática a estimulação na faixa do UV ao vermelho do espectro e ampliamos os dados anteriores demonstrando que a codificação de cor envolvendo o UV está presente no nível da retina interna. Foram registrados um total de 181 neurônios na retina da tartaruga, 36 dos quais foram oponentes. Entre esses neurônios dez foram células amácrinas ($\approx 5\%$) e 26 foram células ganglionares ($\approx 15\%$). Identificação morfológica de neurônios cromaticamente oponentes foi obtida em duas células amácrinas (A23b e A19) e 4 células ganglionares (G20, G21, G17 e G24). As respostas de várias células registradas na retina interna mostraram um perfil complexo e um potencial para processamento complexo do estímulo cromático, com componentes de respostas dependentes dos comprimentos de onda e da intensidade do estímulo. Onze tipos de oponência cromática foram encontrados nas células ganglionares no presente trabalho. Considerando resultados prévios do próprio laboratório, um total de doze diferentes tipos de oponência cromática já foram encontrados em células ganglionares. A maioria das células ganglionares registradas teve oponência cromática do tipo R+UVBG- e RG+UVB. Outros tipos de oponência foram menos frequentes. Os resultados do presente estudo confirmaram e ampliaram dados anteriores sobre a participação do canal UV no processamento de cor na retina interna da tartaruga. Esse estudo mostra ainda que a tartaruga

tem um mecanismo fisiológico para reproduzir quase todas as combinações cromáticas de um sistema tetracromata.

ABSTRACT

The turtle retina has been used extensively as a model for the study of the neural mechanisms of chromatic processing. Color opponency has been studied previously with 3 stimuli (red, green and blue light). However, behavioral studies showed that the turtle has a tetrachromatic visual system with the addition of the UV channel. Recently our laboratory reported data concerning the response properties of horizontal, bipolar, amacrine and ganglion cells to stimuli in the UV-visible range. In the present investigation we recorded color opponent responses from amacrine and ganglion cells to stimuli in the UV and visible ranges and extended our previous demonstration that UV color-coding is present at the level of the inner nuclear layer. We recorded from a total of 181 neurons of the turtle inner retina, 36 of which were spectrally opponent. Among these there were ten amacrine ($\approx 5\%$) and 26 ganglion cells ($\approx 15\%$). Morphological identification of the chromatically opponent neurons was obtained in 2 amacrine (A23b and A19) and 4 ganglion cells (G20, G21, G17 e G24). Many cells showed a very intricate picture, with a variety of response types and a potential for complex processing of chromatic stimuli, with intensity- and wavelength-dependent response components. Eleven types of chromatic opponency were found in ganglion cells, and adding previous results from the laboratory, a total of 12 types of opponent responses have been found. The majority of the ganglion cell recordings showed R+UVBG- and RG+UVB- chromatic opponency. Other types of chromatic opponency were less frequent. The results of the present study confirm the participation of a UV channel in the processing of color opponency in the inner retina of the turtle. This study shows that the turtle has the physiological mechanisms for reproducing almost all of the possible chromatic combinations.

1. INTRODUÇÃO

“ To suppose that the eye, with all its inimitable contrivances for adjusting the focus to different distances, for admitting different amounts of light, and for the correction of spherical and chromatic aberration, could have been formed by natural selection, seems, I freely confess, absurd in the highest possible degree.”

Esta frase foi escrita por Charles Darwin em sua fantástica obra intitulada “A Origem das Espécies por Seleção Natural” (The Origin of Species by Natural Selection, (DARWIN, 1859), demonstrando todo o seu fascínio quando este se deparou com a enorme diversidade de tamanhos, formatos e princípios ópticos desenvolvidos por diferentes animais para a captação do estímulo visual. Desafortunadamente, Charles Darwin não pode ter acesso à arquitetura da retina, como Santiago Ramon y Cajal, o qual não apenas observou, mas descreveu de maneira singular a grande diversidade de tipos neuronais presentes na retina de diferentes espécies de vertebrados.

Ao estudarmos a arquitetura funcional do sistema visual de vertebrados, notamos que a diversidade de tipos neuronais descrita por Ramon y Cajal (1892) é refletida nas diferentes propriedades fisiológicas destes neurônios. A complexidade funcional de células retinianas varia significativamente na medida em que observamos diferentes ramos da árvore filogenética dos vertebrados (Figura 1). Como a percepção do ambiente é limitada por estruturas que recebem e processam a informação sensorial, fica evidente que entre os vertebrados encontraremos diferentes maneiras de perceber o ambiente circundante.

A capacidade de um animal perceber o colorido do ambiente está baseada no fato de seu sistema visual ser dotado de pelo menos dois tipos de células fotorreceptoras, sensíveis a diferentes regiões do espectro de luz, e uma circuitaria neural associada que

decodifica a mensagem de cor do ambiente. Assim, podemos então conjecturar que quanto maior a variedade de fotorreceptores disponíveis, maior é a riqueza na experiência e discriminação cromática do animal.

Animais como aves, peixes teleósteos e répteis são em geral animais tetracromatas (EBREY & KOUTALOS, 2001; HART, 2001) os quais têm quatro tipos de cones e uma sensibilidade à radiação visível que abrange do ultravioleta ao vermelho. Entre os mamíferos a grande maioria tem visão dicromata (JACOBS, 1993; YOKOYAMA, 2002) a tricromacia é apenas observada em alguns marsupiais (ARRESE *et al.*, 2002; ARRESE *et al.*, 2005) e alguns primatas (NATHANS *et al.*, 1986; SILVEIRA *et al.*, 1999; LEE *et al.*, 2000; ROWE, 2002; SILVEIRA *et al.*, 2003).

No texto acima foi utilizado o termo percepção de cor para que tenhamos uma reflexão sobre dois aspectos: o primeiro, é que o sistema visual pode representar o ambiente de diferentes maneiras; o segundo - que está intimamente ligada ao primeiro - é que essa representação do ambiente depende de um suporte neural para a sua realização.

Talvez mais do que em qualquer outra classe dos vertebrados, o desenvolvimento da visão atingiu a sua maior complexidade em répteis (WALLS, 1942). Com exceção das aves, com as quais os répteis estão próximos filogeneticamente, a visão e suas estruturas acessórias são menos complexas em outros animais. Os répteis foram os primeiros vertebrados a transferir completamente suas vidas para o ambiente terrestre. Para eles, o ar ofereceu um meio claro para a visão, com grandes vantagens asseguradas pela passagem retilínea da luz. A vida na terra requer altos padrões de visão alcançados através de uma nova anatomia e novas funções, como a visão tetracromata (GRANDA & DVORAK, 1977). Um exemplo do que estamos nos referindo é evidenciado na variedade morfológica dos tipos de cones que encontramos na retina de répteis e aves em comparação com os tipos de cones encontrados na retina de mamíferos (Figura 1).

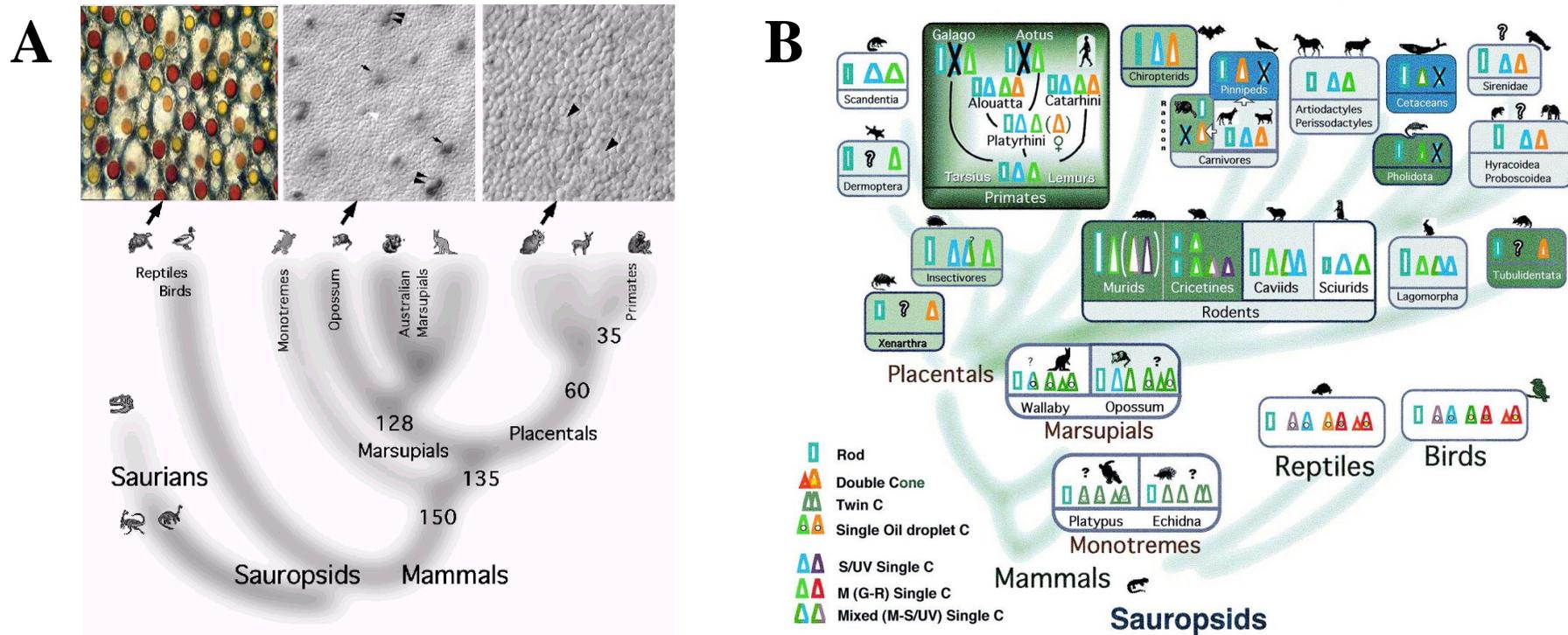


Figura 1. Evolução de répteis, aves e mamíferos a partir dos ancestrais sauropsídeos. (A) Árvore filogenética simplificada mostrando a radiação mútua de mamíferos e dinossauros durante o período Mesozóico. Micrografia: cones de tartaruga (esquerda) com uma variedade de gotículas de óleo, característica de retinas fotópticas que foi provavelmente presente em dinossauros diurnos e ancestrais pré-mamíferos. (centro) Cones de um representante dos marsupiais (gambá), cones duplos e com gotícula de óleo foram identificados nestes animais. Mamíferos placentários (direita) têm em geral apenas dois tipos de cones e sem gotícula de óleo. (B) Árvore filogenética semelhante à descrita em (A) com detalhamento dos tipos de fotorreceptores encontrados nas diferentes classes de vertebrados (AHNELT & KOLB, 2000).

Entre os representantes da classe *Reptilia*, três espécies de tartarugas são as mais utilizadas para estudos da retina e estruturas visuais acessórias: *Pseudemys scripta elegans*, *Mauremys caspica*, e *Geoclemys reevesii*. Contudo, a maior parte da literatura disponível está apoiada sobre estudos na primeira espécie.

A tartaruga *Pseudemys scripta elegans* tem sido um dos alvos preferenciais de investigação na neurociência visual (para revisão ver AMMERMULLER & KOLB, 1996). O fácil acesso ao tecido retiniano e a estabilidade deste material por um longo período de tempo em um sistema experimental, somado a um tamanho maior de neurônios em relação a outros vertebrados, o que torna mais fácil o acesso a registros intracelulares, tornou esse animal um bom modelo experimental para investigações do funcionamento do sistema visual.

Atualmente existe uma vasta literatura dedicada ao sistema visual da tartaruga. Nitidamente nota-se a grande complexidade existente na retina deste animal, funções apenas observadas no córtex visual de muitos vertebrados são realizadas na retina da tartaruga por células amácrinas e ganglionares. Registros eletrofisiológicos de células ganglionares têm mostrado que muitas dessas células são complexas na organização do campo receptivo (GRANDA & FULBROOK, 1989; SERNAGOR & GRZYWACZ, 1995; GRANDA *et al.*, 1999; DEARWORTH, & GRANDA, 2002). Muitos neurônios na retina interna respondem preferencialmente a estímulos como cor, orientação, movimento e direcionalidade (MARCHIAFAVA, 1979; BOWLING, 1980; MARCHIAFAVA & WAGNER, 1981; JENSEN & DEVOE, 1982; JENSEN & DEVOE, 1983; MARCHIAFAVA, 1983; WEILER & AMMERMULLER, 1986; AMMERMULLER & WEILER, 1988; GRANDA & FULBROOK, 1989; AMMERMULLER *et al.*, 1995; AMMERMULLER & KOLB, 1995; BORG-GRAHAM, 2001). Além disso, as redes de células horizontais e amácrinas fazem um importante papel nesse processamento, e são mais diversas morfológica e fisiologicamente do que as de outros vertebrados.

Neste momento da exposição é oportuno delinear um esboço da anatomia funcional da retina da tartaruga. Assim passaremos para o que atualmente se conhece sobre a retina da tartaruga.

1.1. O SISTEMA VISUAL DA TARTARUGA

A estrutura da retina da tartaruga segue o padrão básico da retina de vertebrados (RAMON Y CAJAL, 1982). Na figura 2, apresentamos uma visão radial da retina da tartaruga corada histologicamente com Hematoxilina-Eosina, onde apenas corpos celulares estão marcados nas três camadas nucleares, as quais são intercaladas pelas camadas plexiformes (áreas claras).

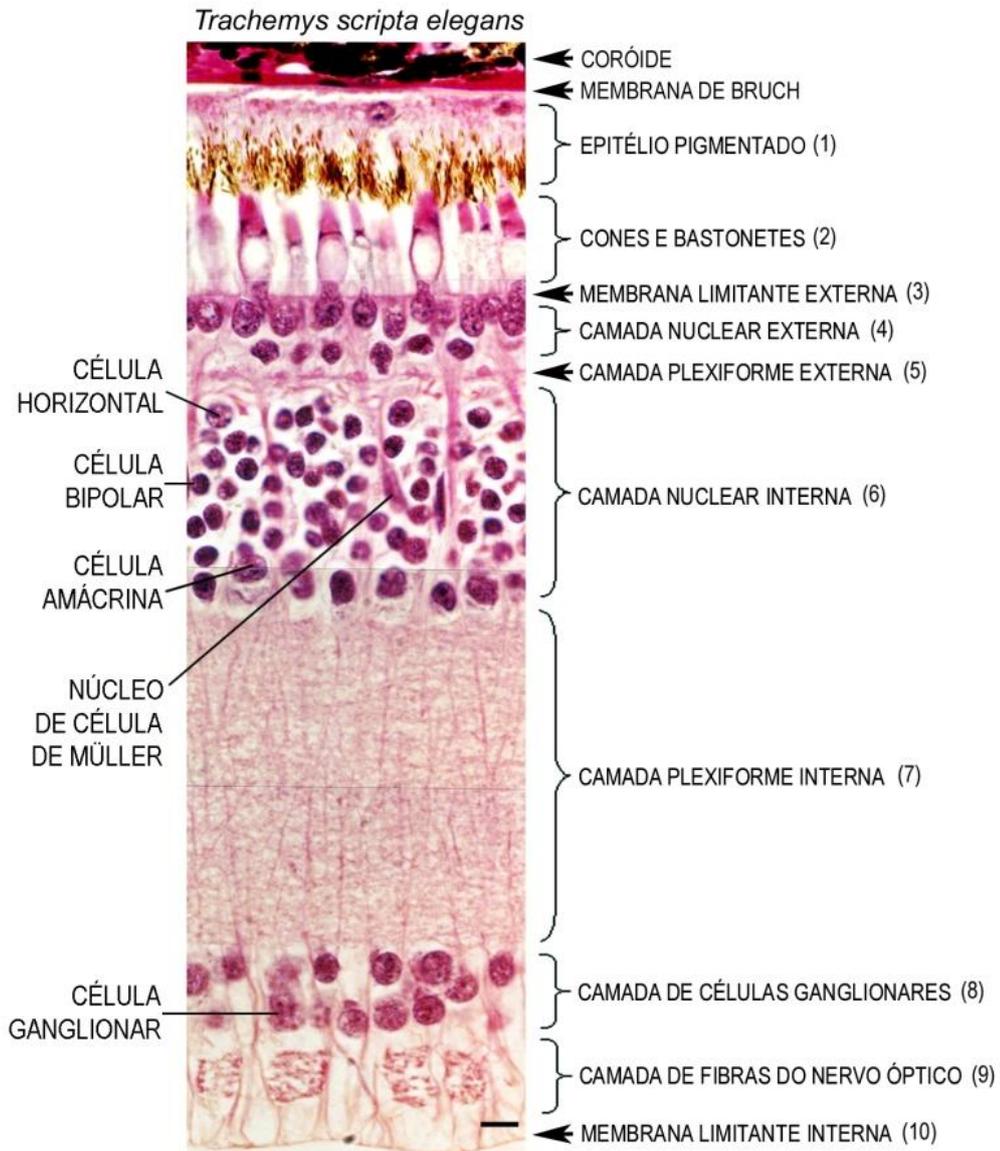


Figura 2. Corte radial da retina da tartaruga corado com Hematoxilina-Eosina, mostrando disposição de todas as camadas celulares e intercelulares. (Figura gentilmente cedida por Sonia Grötzner). Escala = 10 μm .

1.1.1. Neurônios de Primeira Ordem

A retina da tartaruga tem sete tipos de cones e apenas um tipo de bastonete. Há quatro tipos de cones R, um cone G, um cone B e um cone UV¹. Entre os cones R, dois são cones simples, um tem uma gotícula de óleo vermelha localizada entre o segmento interno e o segmento externo do próprio cone, e o outro tem uma gotícula laranja; as gotículas de óleo funcionam como “filtros” para restringir o espectro de luz que alcançará o fotorreceptor (KOLB *et al.*, 2001). Ambos estes cones têm picos de sensibilidade espectral $S(\lambda)$ entre 620 e 644nm (GRANDA & DVORAK, 1977; LIPETZ, 1984; OHTSUKA, 1985; LOEW & GOVARDOVSKII, 2001). Os outros dois tipos de cones R juntos constituem um cone duplo, e o membro principal deste cone tem uma gotícula de óleo laranja; no membro acessório não existe gotícula, e sim grânulos de pigmento dispersos na região correspondente à gotícula (KOLB & JONES, 1987). Os picos de $S(\lambda)$ do membro principal e acessório estão em torno de 620 a 630nm (LIPETZ, 1984; OHTSUKA, 1985). No cone G há uma gotícula amarela e o pico de sensibilidade $S(\lambda)$ é em 540nm (OHTSUKA, 1985). Os cones B e UV têm picos de $S(\lambda)$ em 460 e 372nm, respectivamente (KOLB & JONES, 1987; LOEW & GOVARDOVSKII, 2001; VENTURA *et al.*, 2001). Ambos os cones têm gotícula incolor, porém a gotícula encontrada no cone B fluoresce sob luz ultravioleta (OHTSUKA, 1985), o que facilita a distinção entre os dois. Na figura 3, mostramos uma imagem de uma retina de tartaruga montada a fresco com os fotorreceptores voltados para cima. A primeira fileira mostra imagens de diferentes regiões da retina central da tartaruga iluminada com luz branca notamos na imagem que existem gotículas vermelhas (cones L), laranjas (cones M) e incolores (cones B ou UV). Na fileira seguinte a mesma região é novamente mostrada,

¹ Os cones com sensibilidade máxima para luz ultravioleta, azul, verde e vermelha serão denominados cones UV, B, G e R, respectivamente. As abreviações em inglês foram escolhidas por serem mais usadas normalmente pelos pesquisadores brasileiros.

contudo sob iluminação UV. Na imagem notamos que algumas gotículas incolores ficam fluorescentes (cones B) sob essa iluminação e outras ficam pálidas (cones UV). As fileiras seguintes são de imagens da região periférica da retina onde podemos observar um aumento no diâmetro das gotículas de óleo dos fotorreceptores. Um esquema ilustrativo da morfologia das células fotorreceptoras da tartaruga também é apresentado na figura 4, abaixo mostramos também uma tabela com a sensibilidade espectral de cada fotorreceptor.

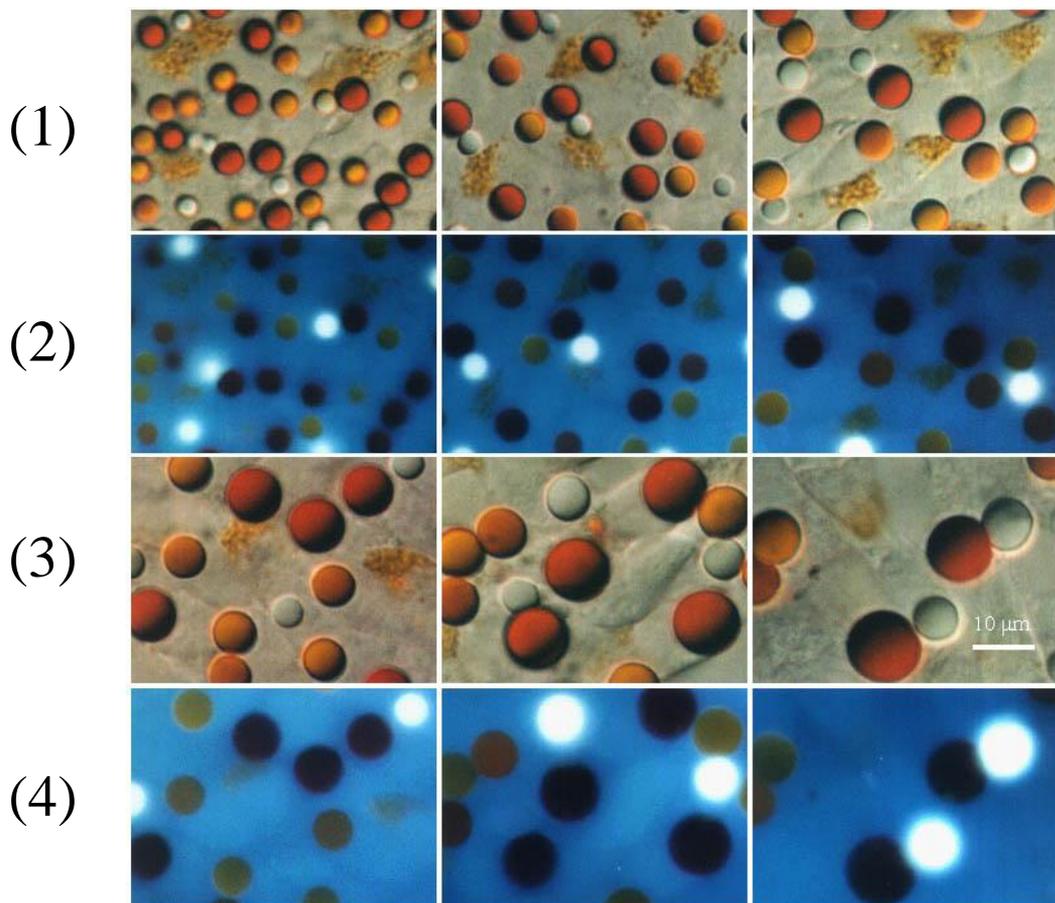


Figura 3. Pares de fotomicrografias da retina da tartaruga visualizadas sob luz transmitida (fileiras 1 e 3) e sob radiação UV (fileiras 2 e 4). Note que algumas gotículas transparentes têm fluorescência sob iluminação UV (cones B) e outras gotículas transparentes não tem fluorescência (cones UV). (escala = 10 μm). (Imagens cedidas gentilmente por Nascimento e Ventura).

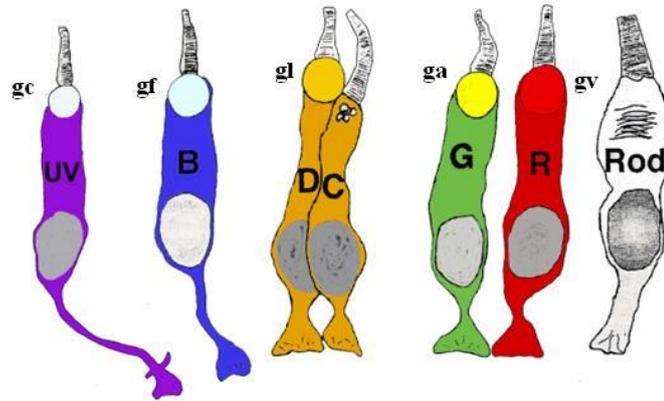


Figura 4. Diagrama esquemático da morfologia das células fotorreceptoras da tartaruga. Os cones UV (ultravioleta), B (azul), G (verde) e R (vermelho) são cones simples, todos com presença de gotícula; no cone duplo (DC) existe gotícula de óleo apenas no membro principal; no bastonete não há gotícula. gc (gotícula clara), gf (gotícula fluorescente), gl (gotícula laranja), ga (gotícula amarela), gv (gotícula vermelha). (modificado de GOEDE & KOLB, 1994). Escala = 10 μ m.

Tabela 1. Picos de Sensibilidade espectral das opsinas e das gotículas de óleo da *Trachemys scripta elegans*

FOTORRECEPTORES									Estudos
	Bastonete	Cone duplo		Cones simples					
		Principal	Acessório	R1	R2	G	B	UV	
Opsina	518	617	617	617	617	515	458	372	(1) Microspectro-fotometria.
Gotícula	---	L 552	---	V 595	L 548	A 533	F 413	T	
	---	---	---	---	---	---	---	372	(2) Método de resposta constante dinâmica

L = gotícula laranja; V = gotícula vermelha; A = gotícula amarela; F = gotícula fluorescente; T = gotícula transparente. 1 - LOEW & GOVARDOVSKII, 2001; 2 - VENTURA *et al.*, 2001.

1.1.2. Neurônios de Segunda Ordem

a) Células bipolares

Na retina da tartaruga, atualmente são descritos 13 diferentes tipos morfológicos de células bipolares (AMMERMULLER & KOLB, 1995; AMMERMULLER & KOLB, 1996), as quais são neurônios de segunda ordem envolvidos na comunicação vertical entre os fotorreceptores e as células ganglionares. As células bipolares foram classificadas quanto ao padrão de estratificação do terminal axonal nos 5 estratos da camada plexiforme interna (CPI), conforme ilustrado na figura 5. As células B1, B2, B5 e B11, têm o terminal axonal ramificando em apenas um estrato (monoestratificadas). As células B4, B6, B8, B9 e B10 são biestratificadas, ou seja, com ramificação em dois estratos, as células bipolares B3, B7, NB e PKC são triestratificadas e aparecem em menor quantidade em relação as outras células bipolares na retina de tartaruga. Todas as células bipolares parecem ter um antagonismo centro-periferia na organização do campo receptivo (AMMERMULLER & KOLB, 1995; AMMERMULLER & KOLB, 1996). Análises em dois tipos de células bipolares (B4 e B6) indicam que estes seguem as mesmas “regras” morfofisiológicas para a arquitetura de vias centro ON-OFF da retina de vertebrados (KOLB, 1994). Uma característica comum a todos os tipos de células bipolares é a presença de “*landolt clubs*” surgindo de seus dendritos na CPI e passando dentro da CNE. Glutamato parece ser o neurotransmissor utilizado por estes tipos celulares (EHINGER *et al.*, 1988), contudo, serotonina já foi identificada em células B9 (WEILER & SCHUTTE, 1985; SCHUTTE & WEILER, 1988; TAUCHI, 1989; HURD & ELDRED, 1993). Entre as células bipolares apenas dois tipos têm respostas cromáticas: B10 e B11. Na figura 6 mostramos o desenho esquemático da célula bipolar do tipo B10 e os registros intracelular (HAVERKAMP *et al.*, 1999).

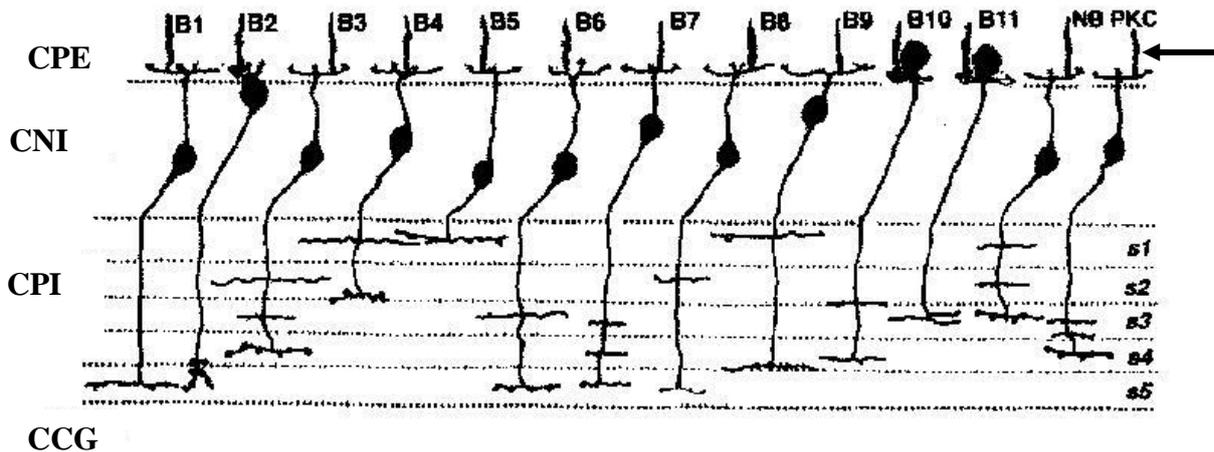


Figura 5. Diagrama esquemático da morfologia dos tipos de células bipolares da retina da tartaruga. Nas células desenhadas em uma visão vertical, podem ser observados o corpo celular, os dendritos celulares e os “*landolt clubs*” (seta) na camada plexiforme externa (CPE) da retina e a estratificação dos terminais axonais nos cinco estratos (S1-S5) da camada plexiforme interna (CPI). Notem os corpos celulares das células B10 e B11 tipicamente deslocados para a camada nuclear externa. NB: célula bipolar identificada com neurobiotina; PKC: célula bipolar imunorreativa para anticorpos PCK- α (Figura modificada de AMMERMÜLLER & KOLB, 1996).

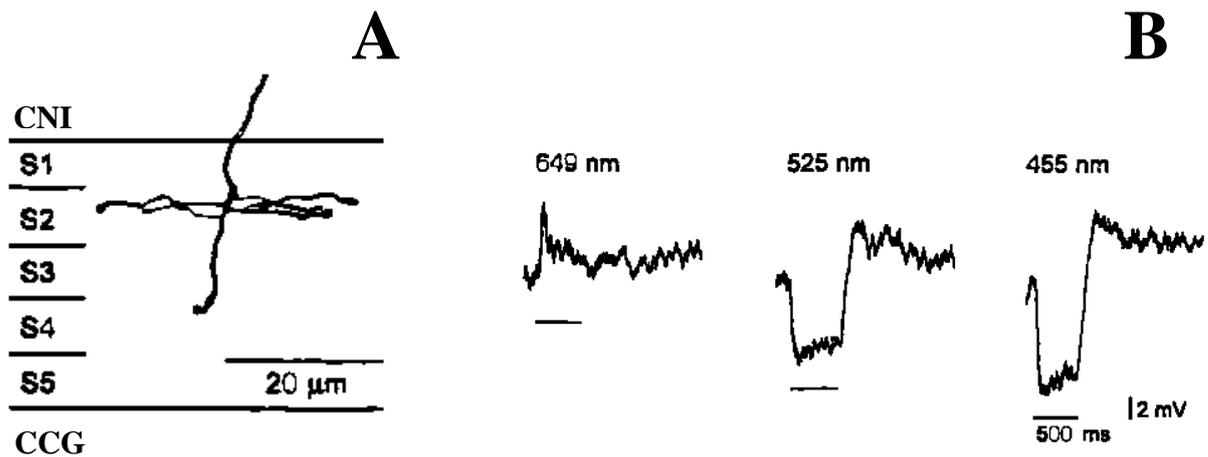


Figura 6. Morfologia e respostas de uma célula bipolar B10. (A) Desenho esquemático da célula bipolar B10 estratificando nas sublâminas s2 e s4. (B) Respostas a estímulos circulares (800 μm de diâmetro) nos comprimentos de onda de 649 nm, 525 nm, e 455 nm mostram que a célula biopolar tem oponência cromática do tipo vermelho-ON, azul/verde-OFF. (Figura modificada de HAVERKAMP *et al.*, 1999).

b) Células horizontais

As células horizontais também são neurônios de segunda ordem, porém interligadas lateralmente com os fotorreceptores, de maneira a modular a via vertical entre fotorreceptores e células bipolares. Estudos que utilizaram a técnica de Golgi ou que combinavam o registro e a marcação intracelular de células horizontais revelaram quatro diferentes tipos morfológicos na retina da tartaruga, chamados de H1, H2, H3 e H4 (MILLER *et al.*, 1973; LEEPER, 1978a; LEEPER, 1978b; LEEPER & COPENHAGEN, 1982; KOLB *et al.*, 1988; AMMERMULLER *et al.*, 1995; AMMERMULLER & KOLB, 1995), ilustrados na figura 6.

A célula H1 consiste em duas estruturas morfológicamente diferentes: o corpo celular (H1CC) e o terminal axonal (H1TA). O terminal axonal é a estrutura mais freqüentemente registrada por eletrofisiologia; responde de maneira monofásica

(hiperpolarizante) a todos os comprimentos de onda do espectro visível da tartaruga, o que caracteriza uma célula de luminosidade, e assim chamada de unidade L1. Esta unidade recebe conexões de cones L simples, membro principal de cones duplos e de bastonetes (FUORTES & SIMON, 1974). O corpo celular (unidade L2), também responde de maneira monofásica à luminosidade, e recebe contatos sinápticos com dois tipos de cones, cones L e M simples e ambos os membros do cone duplo (LEEPER, 1978b; OHTSUKA & KOUYAMA, 1986).

As células H2 e H3, ao contrário da célula H1, são células de cromaticidade (Tipo C), pois têm respostas oponentes (contrárias) a diferentes comprimentos de onda. A célula H2 é o tipo mais freqüente registrada eletrofisiologicamente. Esta célula é despolarizada por estímulos na faixa do vermelho e hiperpolarizada pelo azul e verde esse tipo de resposta é conhecido como resposta bifásica. A célula H3, por outro lado é despolarizada pelo verde e hiperpolarizada pelo azul e vermelho (resposta trifásica). Na figura 7 mostramos a morfologia e o espectro de ação das células horizontais H1 (H1CC e H1TA), H2 e H3.

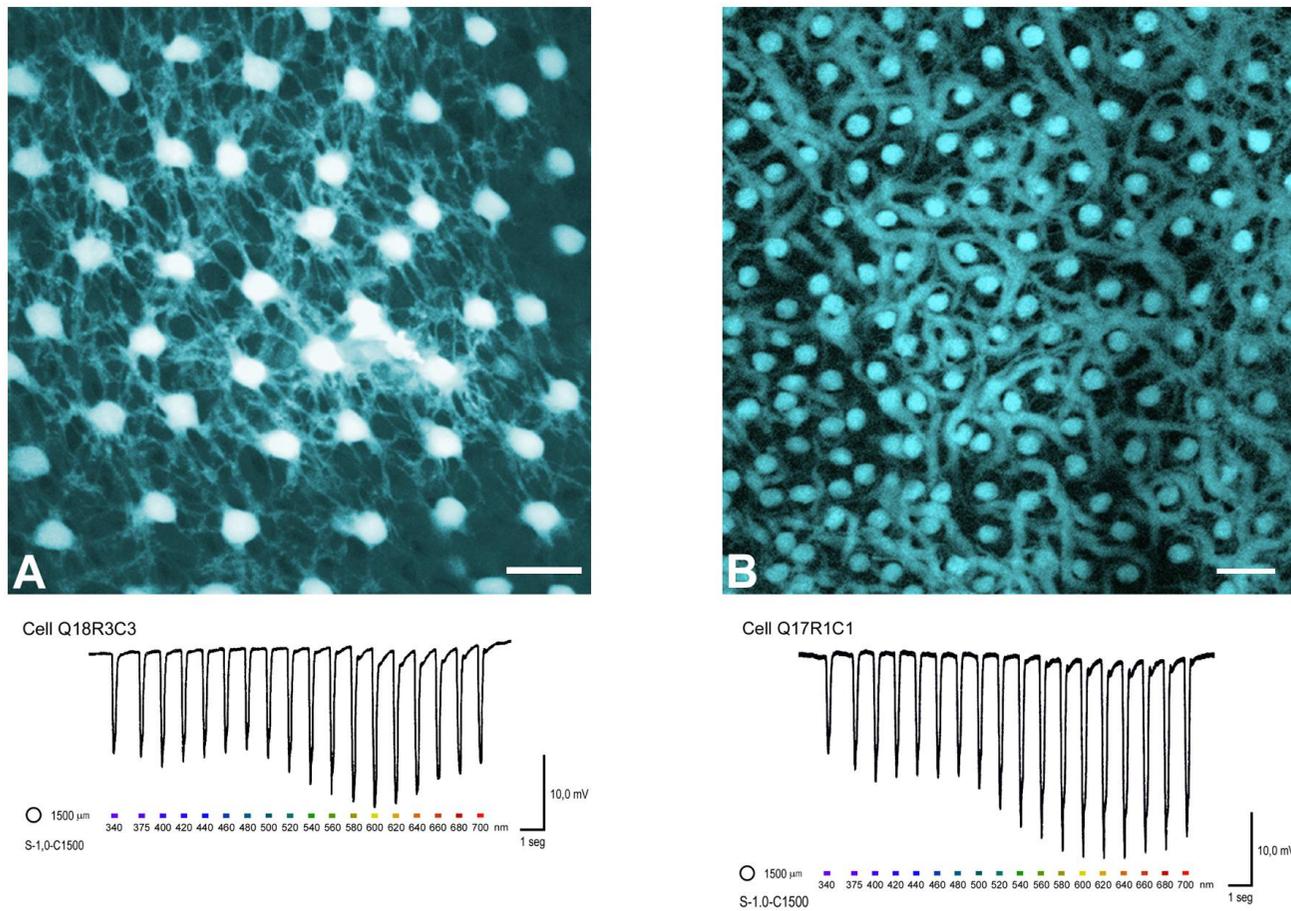


Figura 7.

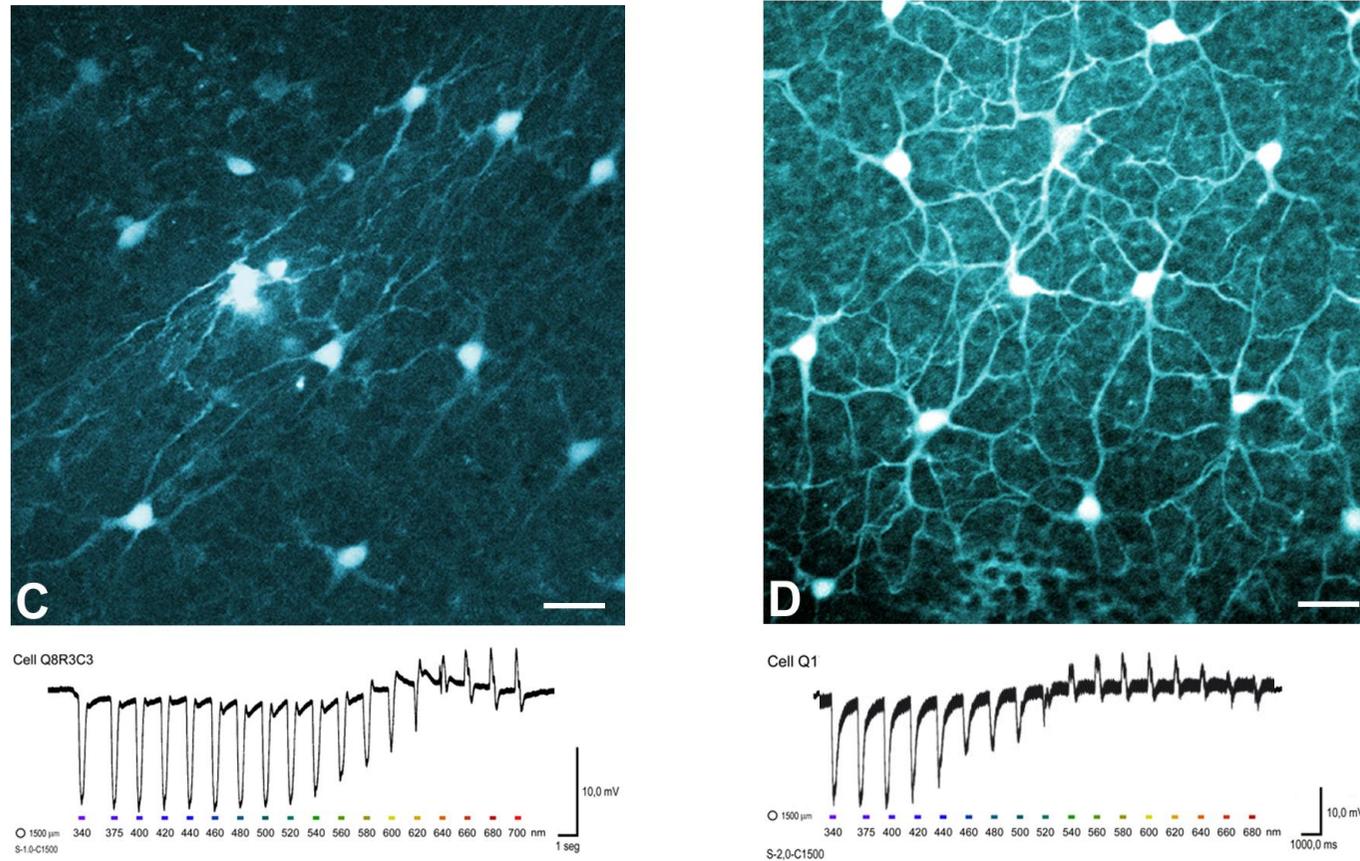


Figura 7. Morfologia e respostas eletrofisiológicas das células horizontais da retina de *Trachemys s. elegans*. (A) célula horizontal do tipo H1-CC, (B) tipo H1-TA, (C) tipo H2 e (D) tipo H3. Abaixo de cada célula estão as respostas eletrofisiológicas à série de pulsos de luz monocromática. (imagens cedidas gentilmente por Sonia R. Grötzner). Escalas = 25 μm.

1.1.3. Neurônios de Terceira Ordem

Células amácrinas e ganglionares formam a última estação de processamento da informação visual na retina. Baseado em estudos que utilizaram a técnica de Golgi (KOLB, 1982) e técnicas que combinavam o registro e a marcação intracelular (AMMERMULLER *et al.*, 1995; AMMERMULLER & KOLB, 1995), foi possível identificar 37 tipos de células amácrinas e 24 tipos de células ganglionares na retina da tartaruga. Essa grande quantidade de diferentes tipos neurais, juntamente com os 13 tipos de células bipolares da camada nuclear interna, contribui para um processamento de grande complexidade na CPI.

Crítérios como o padrão de ramificação e características da estratificação dendrítica nos cinco estratos da CPI, morfologia dendrítica, tamanho do corpo celular e dimensão do campo dendrítico foram os principais parâmetros de classificação das células amácrinas e ganglionares. Durante o curso dos estudos morfológicos e eletrofisiológicos (KOLB, 1982; KOLB *et al.*, 1988; AMMERMULLER *et al.*, 1995; AMMERMULLER & KOLB, 1995), foram adotados siglas alfanuméricas numéricas para identificar células amácrinas e ganglionares, tais como A1-A37 e G1-G24.

Funcionalmente, células amácrinas e ganglionares têm quatro tipos básicos de respostas: despolarização sustentada; hiperpolarização sustentada; despolarização transiente e hiperpolarização transiente.

Algumas células amácrinas e uma grande proporção de células ganglionares são seletivas à direção de movimento do estímulo na retina da tartaruga i.e. A9, A20 e A22, e G19, G20 e G24 (MARCHIAFAVA, 1979; BOWLING, 1980; JENSEN & DEVOE, 1982; JENSEN & DEVOE, 1983; GRANDA & FULBROOK, 1989; KITTLA & GRANDA, 1994; AMMERMULLER *et al.*, 1995; BORG-GRAHAM, 2001).

1.2. PROCESSAMENTO CROMÁTICO

No tópico anterior pudemos notar que a oponência cromática no sistema visual da tartaruga tem início logo nas primeiras sinapses da retina. Células horizontais H2 e H3 são tipos cromáticos que têm respostas oponentes dependentes do comprimento de onda em que são estimuladas (FUORTES & SIMON, 1974; AMMERMULLER *et al.*, 1995; VENTURA *et al.*, 1999; ZANA *et al.*, 2001; VENTURA *et al.*, 2001; TWIG & PERLMAN, 2004). Dois tipos de células bipolares (B10 e B11) também têm propriedades de respostas oponentes (YAZULLA, 1976; AMMERMULLER *et al.*, 1995). Na camada nuclear interna (INL) os estudos demonstraram oponência de cor em cinco tipos de células ganglionares: G14 e G24 com codificação de cor no centro do campo receptivo; G3 e G18 com codificação de cor na periferia do campo receptivo; e uma célula ganglionar do tipo G6 com dupla-oponência de cor (vermelho-OFF/verde-ON no centro e vermelho-ON/verde-OFF na periferia do campo receptivo). Entre as células amácrinas cinco tipos também têm oponência cromática: A1, A3 e A23b com oponência do tipo vermelho-OFF/azul-ON no centro do campo receptivo; A32 com oponência do tipo red-OFF/verde-ON no centro do campo receptivo; e a A33 com dupla-oponência vermelho-ON/azul-OFF no centro e verde-OFF/azul-ON na periferia (AMMERMULLER *et al.*, 1995).

Entretanto, essas configurações de cromaticidade foram estudadas inicialmente com três estímulos (luz vermelha, verde e azul) por Ammermüller e colaboradores (1995). Embora nessa época já tivessem sido descritos dados comportamentais que demonstravam que a tartaruga poderia ser um animal tetracromata, com uma sensibilidade ao UV (ARNOLD & NEUMEYER, 1987), e a própria Kolb (KOLB & JONES, 1987) considerou a existência de um candidato a receptor do UV em estudos morfológicos da retina de tartaruga, os experimentos fisiológicos não incorporaram esse conhecimento. O conjunto de estudos indicando a existência de sensibilidade adicional na faixa do ultravioleta abriu uma discussão

sobre a participação do canal de UV no processo de cor no sistema visual de tartaruga e sua demonstração fisiológica foi obtida em diversos tipos celulares (AMMERMULLER *et al.*, 1998; VENTURA *et al.*, 1999; ZANA *et al.*, 2001; VENTURA *et al.*, 2001).

Visto que o número de combinações de excitação e inibição que são possíveis com três canais de cor (azul, verde e vermelho) são teoricamente oito (2^3), esse número sobe para 16 (2^4) com a adição de mais um canal (UV). Excluindo-se as combinações que são de excitações ou inibições em relação a todos os comprimentos de onda, o número possível de combinações de oponentes é seis para três cones e 14 para quatro cones.

A confirmação sobre a existência do cone UV mostrou que a literatura sobre o processamento cromático em neurônios de tartaruga precisava ser revisada. É necessário determinar quantos e quais canais oponentes existem nessa retina.

Recentemente, alguns trabalhos foram publicados sobre a investigação das propriedades de respostas cromáticas de células horizontais, bipolares, amácrinas e ganglionares envolvendo estimulação dos quatro tipos de fotorreceptores da tartaruga (AMMERMULLER *et al.*, 1998; VENTURA *et al.*, 1999; ZANA *et al.*, 2001; VENTURA *et al.*, 2001). Nestes estudos, observou-se que em ambas as células horizontais cromáticas (H2 e H3) existe participação do canal UV na oponente cromática. Além disso, foi observada também a participação do canal UV no processamento cromático de células amácrinas e ganglionares (VENTURA *et al.*, 1999; ZANA *et al.*, 2001; VENTURA *et al.*, 2001). Um total de oito tipos diferentes de combinações cromáticas em células ganglionares foi encontrado nestes estudos.

1.3. OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Investigar o processamento cromático em um sistema de visão de cor tetracromata na retina da tartaruga (*Trachemys scripta elegans*).

Objetivos específicos:

Investigar quais os tipos de otonências cromáticas existem em células amácrinas e ganglionares na retina da tartaruga;

Classificar morfologicamente as células envolvidas no processamento de cor;

Correlacionar os dados morfológicos e fisiológicos com a classificação proposta na literatura.

2. MÉTODOS

2.1. O ANIMAL

Os experimentos foram realizados com tartarugas da espécie, *Pseudemys scripta elegans*, com comprimento de carapaça entre 17–25 cm. Os animais foram obtidos a partir de doação do IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente). As tartarugas foram guardadas em tanques com plataformas sobre as quais os animais poderiam permanecer fora da água. Os procedimentos de manuseio dos animais foram aprovados pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica da Universidade de São Paulo (ANEXO I).

2.2. PROCEDIMENTOS ELETROFISIOLÓGICOS

As respostas cromáticas das células ganglionares foram obtidas a partir registros eletrofisiológicos intracelulares. Estes registros foram realizados no Laboratório de Psicofisiologia Sensorial (USP).

2.2.1. Preparação do Material Biológico para o Registro Eletrofisiológico

O animal era inicialmente sacrificado por decapitação, com auxílio de uma guilhotina e um dos olhos era imediatamente enucleado após o espinalamento. A cabeça com o outro olho foi mantida a 4°C para uso no dia seguinte.

Após a retirada do globo ocular, executou-se a separação da calota anterior (contendo a córnea e cristalino) da calota posterior por dissecação na altura do limbo esclerocorneano, sendo a calota anterior então desprezada. O passo seguinte era retirar ao máximo o humor vítreo com tiras de papel.

A calota posterior, contendo a retina e os tecidos orbitais remanescentes, foi então colocada em uma placa de petri, onde foram feitos quatro cortes radiais na retina a fim de se manter um padrão de orientação espacial da retina. Para tanto, primeiramente localizou-se a faixa visual² com auxílio de um estereoscópio (Carl Zeiss), fazendo abaixo desta um corte em cada uma das extremidades nasal e temporal; em seguida foram realizados mais dois cortes, um na extremidade superior e outro na inferior da retina. Toda a dissecação foi realizada apenas sob iluminação ambiente tênue na sala de dissecação. A cuia óptica foi então evertida sobre um suporte de madeira balsa. Alfinetes entomológicos foram utilizados para prender a retina no suporte. O suporte foi colocado dentro de uma câmara de perfusão que é apoiada num pedestal plástico que era apoiado em um suporte que permite a movimentação micrométrica da preparação nos eixos X e Y. A preparação juntamente com um micromanipulador e outros acessórios foram mantidos dentro de uma gaiola de Faraday para evitar a intrusão de correntes eletromagnéticas externas. A retina foi irrigada durante todo o procedimento por um fluxo de solução fisiológica de tartaruga (CaCl₂ 4,8 mM, NaCl 96,5 mM, KCl 2,6 mM, MgCl₂ 2 mM, NaHCO₃ 31,5 mM e Glicose 20 mM) oxigenada continuamente (95% oxigênio e 5% dióxido de carbono) e mantida em pH 7,4.

Este tipo de preparação normalmente tem um tempo médio de duração de seis horas. A vantagem da preparação *in vitro*, na qual o conjunto formado pela retina, o epitélio pigmentar e as camadas coroidais é mantido intacto e montado em uma câmara de perfusão, é que a relação anatômica entre fotorreceptores e a camada epitélio pigmentar (CEP) é mantida; visto que as reações do ciclo visual que retorna retinol da forma *all* do fotopigmento para a configuração 11-*cis* ocorrem na CEP, o conjunto retina-epitélio pigmentar-coroide pode manter-se até em altos níveis de iluminação e manter a regeneração dos fotopigmentos *in vitro* (DACEY & LEE, 1999). Além disso, esse tipo de preparação permite a estimulação

² Faixa visual – um tipo de especialização retiniana encontrada em alguns vertebrados.

luminosa do mosaico de fotorreceptores, o registro elétrico de células retinianas e a marcação neuronal intracelular.

2.3. EQUIPAMENTO DE REGISTRO

Para os registros eletrofisiológicos intracelulares foram usados eletrodos confeccionados com tubos microcapilares de silicato de boro de diâmetros externo e interno de 1 mm e 0,75 mm (Modelo TW100-6, World Precision Instruments). As pontas foram formadas utilizando-se um estirador de microeletrodos a laser (Modelo P-2000, Sutter Instruments). Os eletrodos foram preenchidos com uma solução condutora de KCl (0,5 M). Apenas quando se pretendia marcar as células registradas, as pontas foram preenchidas com Neurobiotina a 4%. Os eletrodos foram colocados em um porta eletrodo, cujo avanço (geralmente em passos de 2,5 μm) é controlado por um microposicionador hidráulico (Modelo 2670, David Kopf), com controle remoto.

As respostas elétricas das células foram captadas com um amplificador (Modelo Intra 767, World Precision Instruments), monitoradas com um osciloscópio digital (Modelo TDS 210, Tektronix), e continuamente digitalizadas a uma taxa de 1 KHz por um computador equipado com uma placa de aquisição de dados (National Instruments, Austin, TX).

2.4. ESTIMULAÇÃO ÓPTICA

Baseado em um sistema óptico Maxwelliano, o sistema de estimulação foi constituído de dois canais. O primeiro canal consiste em uma lâmpada de xenônio de 75W acoplada a um monocromador Bausch and Lomb de luz UV-visível com um fluxo máximo de fótons de 4.6×10^{14} q/s/cm² em 472 nm. A luz da lâmpada passa inicialmente pelo monocromador, que divide a luz em faixas estreitas de comprimentos de onda. A largura da faixa pode ser ajustada pela regulagem das fendas de entrada e saída de luz. A saída do

monocromador é dirigida à entrada de uma fibra óptica. A saída da fibra óptica passa sucessivamente por um obturador eletromagnético, um filtro de densidade neutra, uma lente colimadora, uma íris de fechamento total, um divisor de feixes de quartzo e uma lente fotográfica Nikkor UV de quartzo (Nikon). A imagem formada pelo canal é um círculo de luz com um diâmetro máximo de 2 mm. Este sistema permite também que ao invés de um círculo seja projetada um anel de luz usando-se placas de quartzo, cuja área central é vedada. Para experimentos que envolvem algum tipo de adaptação da retina à luz, um segundo canal óptico pode ser usado, com um LED³ como fonte de luz, cujo fluxo máximo de fótons é de 1.2×10^{17} q/s/cm² de luz. O comprimento de onda para a adaptação pode ser modificado pela troca do LED. A luz do LED passa por uma fibra óptica e sucessivamente por um obturador eletromagnético, uma lente colimadora, e uma íris de fechamento total. O feixe do canal 2 é combinado concentricamente com o feixe do canal 1 pelo divisor de feixes, ambos assim sendo projetados sobre a lente fotográfica.

Todos os parâmetros dos estímulos foram controlados e documentados por um computador. A saída espectral do sistema óptico do canal 1 foi calibrada periodicamente com um radiômetro (International Light Radiometer, modelo 1700, com fotodetector modelo SED033) em todas as combinações possíveis de comprimento de onda e posições do filtro de densidade. Esta calibração foi automatizada por um programa de computador, desenvolvido no próprio laboratório, e sua execução tem uma duração média de quatro horas.

³ Diodo emissor de luz (*light emitting diode*)

2.5. PROCEDIMENTO GERAL

Antes de iniciar os registros o elétrodo foi cuidadosamente posicionado na retina, procurando-se fazer com que sua ponta coincida com o centro do estímulo produzido na retina. Este posicionamento foi realizado com auxílio de uma lupa (Leitz). O local da retina utilizado para esse ajuste não foi usado para registro por ter ficado exposto a luz relativamente intensa. Com o elétrodo já alinhado com a imagem projetada na retina, pode-se mover a preparação mantendo o alinhamento. O passo seguinte foi penetrar outra região da retina utilizando um estímulo de busca até encontrar uma célula de interesse e nela realizar os experimentos programados. Finalizados os testes espectrais na célula encontrada injetávamos (quando possível) neurobiotina na mesma para posterior revelação de sua morfologia. O elétrodo era então removido do tecido e levado a outro ponto da retina, onde se repetia a estimulação.

2.6. PARADIGMA DE ESTIMULAÇÃO

A preparação foi colocada na gaiola de Faraday com luz de fundo de intensidade muita baixa (ca. 2.4×10^1 q/s/cm²). Para encontrar uma célula foi usado um estímulo de busca, que foi uma luz pulsante de 540 nm (luz verde) com intensidade média (-2 log de atenuação) com 600 µm de diâmetro por 100 ms, com intervalos entre os pulsos de um período de escuro de 200 ms. Concomitantemente, avançávamos o microeletrodo com o controle remoto do microposicionador hidráulico (passos de 2,5 µm) ao longo das camadas da retina.

Após a penetração de uma célula e o restabelecimento de seu potencial de repouso os seguintes testes foram realizados: (1) *Íris*, este teste é indicado para se estimar o

tamanho do campo receptivo da célula registrada e ocorre com a execução de uma seqüência de estímulos de diâmetro crescente em um determinado comprimento de onda (Figura 8A).

(2) *V-log I*, este teste consiste na apresentação de uma série de estímulos centrais com aproximadamente igual número de fótons em quatro comprimentos de onda (360, 440, 540 e 640 nm) em intensidade baixa, média e alta, que corresponde respectivamente a 3, 2 e 1 log de atenuação da intensidade máxima do sistema óptico. Este teste tem a finalidade de avaliar a dinâmica da resposta da célula em função da intensidade do estímulo. O teste pode ser repetido com estímulos anulares para testes na periferia do campo receptivo da célula. (3) *Série espectral*, este teste consiste em apresentar uma série de estímulos variando do UV (360 nm) ao vermelho (660 nm) com passos de 20 nm para cada estímulo, todos com o mesmo número de fótons na intensidade máxima. Este teste é realizado para avaliar a resposta da célula ao longo do espectro, contudo de uma maneira mais detalhada e em uma única intensidade.

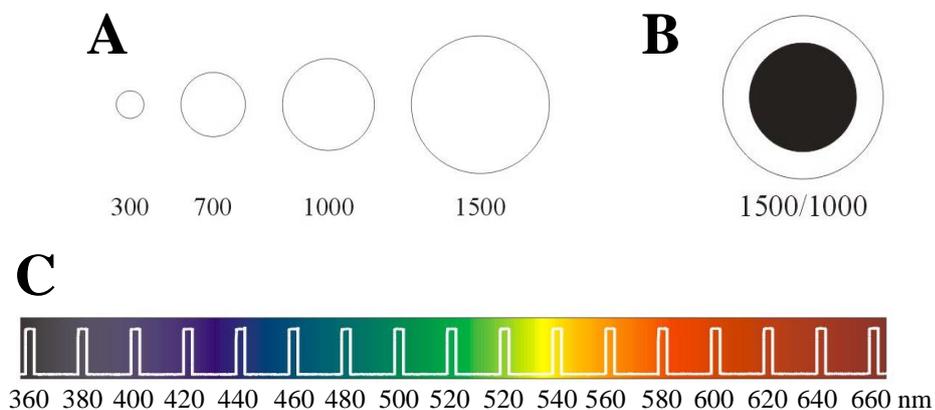


Figura 8. Representação esquemática do protocolo de estimulação utilizado no registro intracelular. (A) Íris, aumento gradual no tamanho do estímulo em um determinado comprimento de onda. (B) Representação da estimulação na forma de anel. (C) Representação esquemática da série espectral, o momento de cada estímulo está representado pela linha branca, os números representam os comprimentos de onda em nanômetros.

Finda a caracterização fisiológica, uma corrente pulsante positiva de 2 mA era passada durante um período de aproximadamente 5 minutos para a injeção de neurobiotina (ver 1.4. PROCEDIMENTO GERAL). Em seguida o eletrodo era removido do tecido e avançado para outro local da retina onde os procedimentos descritos acima foram repetidos. As posições das penetrações foram identificadas com o auxílio de uma base com ajuste micrométrico de posição XY, sobre o qual foi assentado o pedestal da preparação. Os pontos de referência para a localização das células foram a posição do nervo óptico e, quando possível, a faixa visual.

2.7. HISTOLOGIA

Quando houve injeção de Neurobiotina, a retina foi dissecada em solução fisiológica e aplanada sobre papel de filtro (Millipore) com o lado vitreal para cima. Em seguida a retina passou por um processo de fixação por uma hora em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1 M e incubada em uma solução de tampão fosfato 0,1 M, Triton, ázida sódica e CY3 conjugado a streptavidina (994,4:0,5:0,1:5, respectivamente, solução final 1 mL) por 8 h a 4°C. Após lavagem em tampão fosfato 0.1 M, a retina foi montada com uma mistura de glicerol e tampão fosfato 0,1 M (1:1) com 0,1% de parafenilenidiamina, estando então pronta para obtenção de imagens em microscopia confocal (Zeiss Axiovert100 LSM)

2.8. CLASSIFICAÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DAS CÉLULAS GANGLIONARES

As células ganglionares foram classificadas de acordo com a resposta predominante para o acender e apagar do estímulo. Uma resposta foi classificada como sendo do tipo ON ou OFF quando a célula despolarizar ou aumentar a frequência dos potenciais de ação em relação ao estado de repouso com o acender ou com o apagar do estímulo, respectivamente.

Uma célula foi considerada codificadora de cor quando uma oponência espectral foi registrada em pelo menos em um dos níveis de intensidade dos estímulos, no campo receptivo central ou periférico. A codificação de cor foi marcada com os caracteres “-“ e “+” e a letra que representa a região espectral. Por exemplo, a codificação de cor de uma célula despolarizada por luz UV e azul e hiperpolarizada por luz verde e vermelha foi atribuída o seguinte código UVB+ GR-.

2.9. CLASSIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DAS CÉLULAS GANGLIONARES

A identificação morfológica das células marcadas foi baseada no tamanho e forma do campo dendrítico, tamanho do corpo celular, e níveis de estratificação da camada plexiforme interna. Essas características morfológicas foram comparadas com os neurônios descritos em trabalhos anteriores (KOLB, 1982; AMMERMÜLLER & KOLB, 1995; AMMERMÜLLER *et al.*, 1995). A marcação dos neurônios registrados também resolve o problema da discriminação entre células ganglionares e células amácrinas: as respostas de células ganglionares, quando estas não apresentam potenciais de ação, não podem às vezes ser diferenciadas das de células amácrinas. Neste trabalho, células ganglionares foram definidas como aquelas que sua marcação revelou uma morfologia correspondente e/ou que apresentaram potenciais de ação no início do registro.

3. RESULTADOS

3.1. OPONÊNCIA CROMÁTICA EM CÉLULAS GANGLIONARES

De uma maneira geral as respostas das células ganglionares tiveram componentes de respostas dependentes dos comprimentos de onda e da intensidade do estímulo, isto é, componentes que estiveram presentes em determinados parâmetros do estímulo e ausentes quando os parâmetros foram alterados. As respostas de várias células registradas na retina interna mostraram um perfil complexo e um potencial para processamento complexo do estímulo cromático. A consequência para a análise dos resultados foi dificultar a tarefa de classificação do tipo de configuração cromática de uma determinada célula ganglionar em alguns casos que serão detalhados adiante, e que serão devidamente discutidos no momento adequado do texto. Por ora apresentaremos uma síntese dos principais resultados obtidos.

Na retina interna oponência cromática é vista em registros intracelulares nas células ganglionares pela mudança no padrão de disparo de potenciais de ação em resposta ao aparecimento de um estímulo, o que resulta em aumento (excitação) ou diminuição (inibição) na taxa de disparo da célula. Estas duas manifestações correspondem à despolarização (excitação) ou hiperpolarização (inibição) do potencial gerador, que pode ser detectado no soma da célula. Se o eletrodo estiver nessa região o potencial gerador é captado; caso esteja no axônio da célula apenas os potenciais de ação são detectáveis. Nas células amácrinas não existem potenciais de ação em repouso: existem respostas ao acender da luz (ON), ao apagar (OFF) ou a ambas as transições (ON-OFF).

Nesse estudo as respostas de um total de 181 neurônios, entre células amácrinas e ganglionares, foram registrados nas camadas nuclear interna e de células ganglionares, em diferentes regiões da retina. Contudo, a maioria das células registradas ($\approx 80\%$) não

apresentou qualquer tipo de oponência cromática, sendo classificada apenas como ON, OFF, ON-OFF, ou OFF-ON.

Nas células ganglionares encontramos onze diferentes tipos de oponências cromáticas; em alguns casos a oponência foi encontrada apenas no centro ou apenas na periferia do campo receptivo, mas também encontramos células com dupla oponência cromática, ou seja, respostas cromáticas diferentes entre o centro e a periferia do campo receptivo.

Os neurônios registrados neste estudo tiveram um ou mais dos quatro componentes básicos de resposta: (1) despolarização sustentada; (2) hiperpolarização sustentada; (3) despolarizações transientes; (4) hiperpolarizações transientes. As respostas transientes podem ser subdivididas em rápidas e lentas. Como veremos na apresentação dos resultados o perfil das respostas variou muito entre as células registradas.

Um resumo dos tipos de oponências cromáticas encontradas nas células ganglionares está apresentado na Tabela 3.

Tabela 2. Tipos de Codificação de Cor.

Centro do Campo receptivo			Tipos de Respostas				Periferia do Campo receptivo
n	Tipos Morfológicos	Registradas	UV	B	G	R	Registradas
4	G21	G19RC2 ⁻² G25RC2 ⁻¹ G33RC1 ⁻² G35RC1 ^{-2, -1} G47RC4 ^{-2, -1}	-	-	-	+	
3		G14LC6 ^{-2, -1} G49RC1 ^{-2, -1}	+	+	+	-	G49RC5 ⁻¹
5	G17; G22	G04RC6 ⁻¹ G14LC2 ⁻¹ G21RC2 ^{-2, -1} G23LC3 ⁻¹ G27RC8 ⁻¹	-	-	+	+	G23RC3 ⁻¹
2		G52RC1 ^{-2, -1}	+	+	-	-	G40RC1 ⁻¹
1			-	+	-	-	G41RC3 ⁻¹
2		G05RC4 ⁻¹ G42RC2 ⁻³	+	-	+	+	
2		G27C5 ^{-2, -1}	+	-	-	-	G10RC1 ^{-3, -2}
2	G24	G15RC3 ⁻¹ G42LC2 ^{-2; -1}	-	+	+	+	
1		G47LC2 ⁻¹	+	-	-	+	
1		G50RC6 ⁻²	+	-	+	-	

Código das células: G - Célula ganglionar; primeiro número - identifica a tartaruga; L ou R – olho esquerdo (L) ou direito (R); C e número corresponde ao número da célula. Os números acima do código das células indicam nível de intensidade da luz relativo a intensidade máxima possível no sistema óptico. Os caracteres (-) e (+) indicam resposta inibitória e excitatória, respectivamente.

3.1.1. Células Ganglionares com Oponência Cromática R+ UVBG-

Oponência cromática do tipo R+UVBG- foi registrada em cinco células ganglionares, os perfis das respostas de três células diferentes estão ilustrados nas figuras 9, 10 e 11.

Na figura 9A, são mostradas as respostas da célula ganglionar (T19RC2) a estímulos circulares com diâmetro de 700 μm em duas intensidades de teste (média e alta); podemos observar que na intensidade média (-2 log) a célula foi excitada apenas quando luz vermelha foi ligada, para os outros estímulos (UV, azul e verde) a célula respondeu com discreta hiperpolarização no potencial de repouso, caracterizando a resposta cromática do tipo R+ UVBG-, na intensidade alta novamente a luz vermelha provocou excitação da célula com uma despolarização transiente; contudo, observamos também um discreto componente excitatório no acender dos estímulos UV azul e verde seguido de disparo no apagar dos estímulos azul e verde. Na figura 9B mostramos estímulos anulares de luz para a estimulação da região periférica do campo receptivo da mesma célula ganglionar descrita acima. Na intensidade média não foi observada oponência cromática; contudo, na intensidade mais alta a codificação de cor da célula com estímulos anulares foi diferente da observada no centro do campo receptivo (ver Figura 9A): houve neste caso uma resposta despolarizante na região do verde e do vermelho, enquanto que luz UV e azul promoveram respostas hiperpolarizantes no potencial de repouso da célula.

Testes com diferentes diâmetros para os estímulos UV, azul e vermelho com a mesma intensidade (-1 log) também foram realizados nesta célula (Figura 9C). Em nenhuma condição foi observada oponência entre o centro e a periferia do campo receptivo.

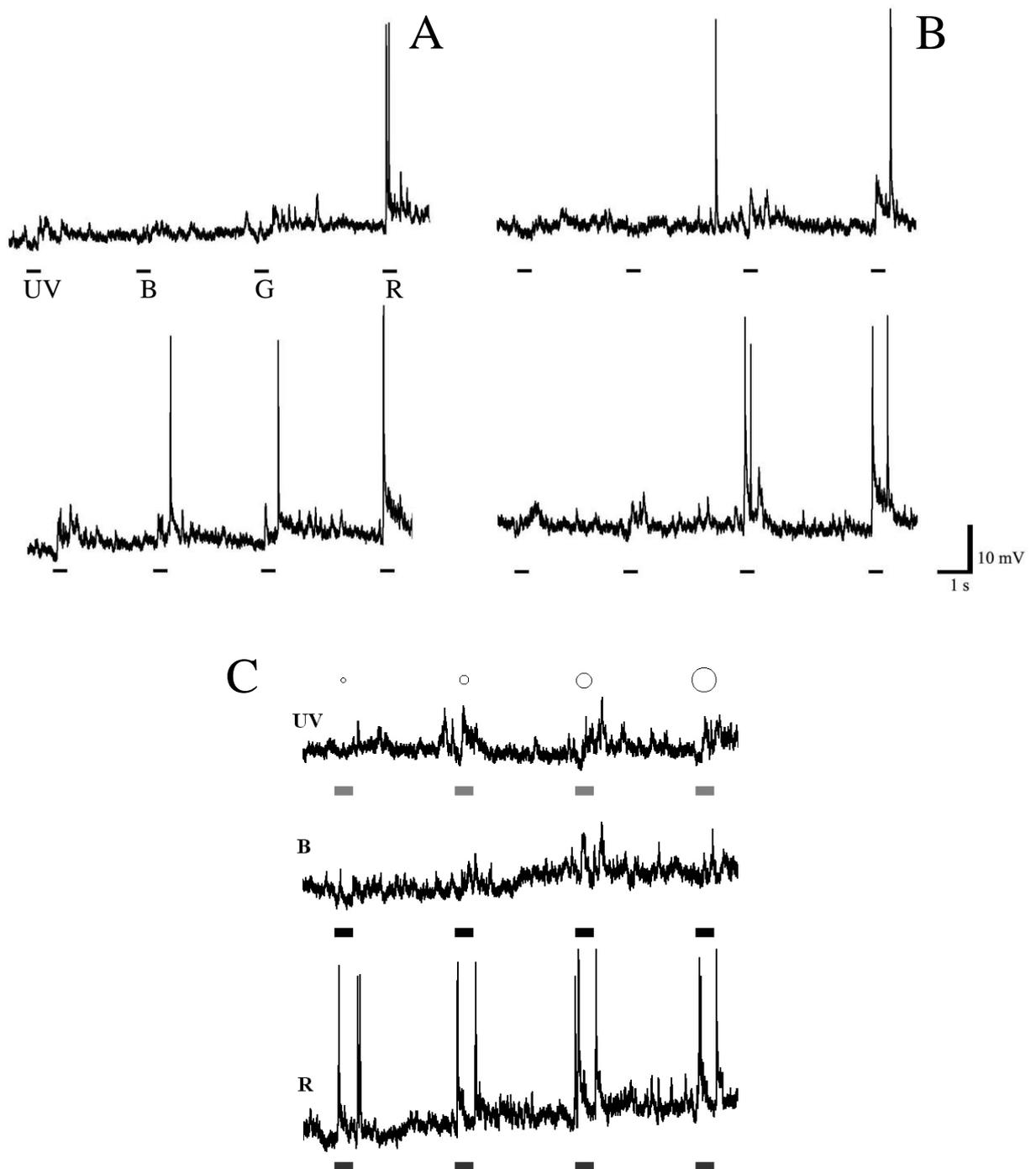


Figura 9. Registros de duas células ganglionares aos estímulos 370 (UV), 450 (B), 540 (G) e 640 nm (R). (A) Registro da célula T19RC2 obtido a partir da estimulação da central do campo receptivo com estímulos circulares ($\varnothing = 700 \mu\text{m}$ de diâmetro) no nível máximo de intensidade ($-1 \log$) (B) Registros da célula T19RC2 obtidos a partir da estimulação da central do campo receptivo com estímulos circulares ($\varnothing = 700 \mu\text{m}$ de diâmetro) em dois diferentes níveis de intensidade (-2 e $-1 \log$). Apenas na intensidade média a resposta cromática é observada.

Na figura 10 mostramos registros de mais duas células ganglionares. Oponência cromática do tipo R+ UVBG- foi observada apenas na intensidade máxima (-1 log) testada na célula ganglionar G-T25C2 com estímulos circulares de 700 μm (Figura 10A). Uma outra célula ganglionar (G - T16C7) teve o mesmo tipo de resposta oponente quando estimulada com estímulos circulares (700 μm) de intensidade média (-2 log); contudo, com o aumento na intensidade a célula comporta-se como uma célula ON, ou seja, despolariza em todos os comprimentos de onda testados (Figura 10B). Não foram realizados testes com estímulos anulares nestas duas células.

Uma célula ganglionar com oponencia do tipo R+UVBG-, foi injetada com sucesso e sua morfologia pode ser analisada (Figura 11). É uma célula de grande porte, mono-estratificada com ramificação entre as sublâminas s4/5. A célula tem um grande corpo celular (24 μm de diâmetro) e ampla árvore dendrítica (790 μm de diâmetro). As características morfológicas desta célula indicam uma semelhança com o tipo G21 segundo a literatura (AMMERMÜLLER & KOLB, 1995).

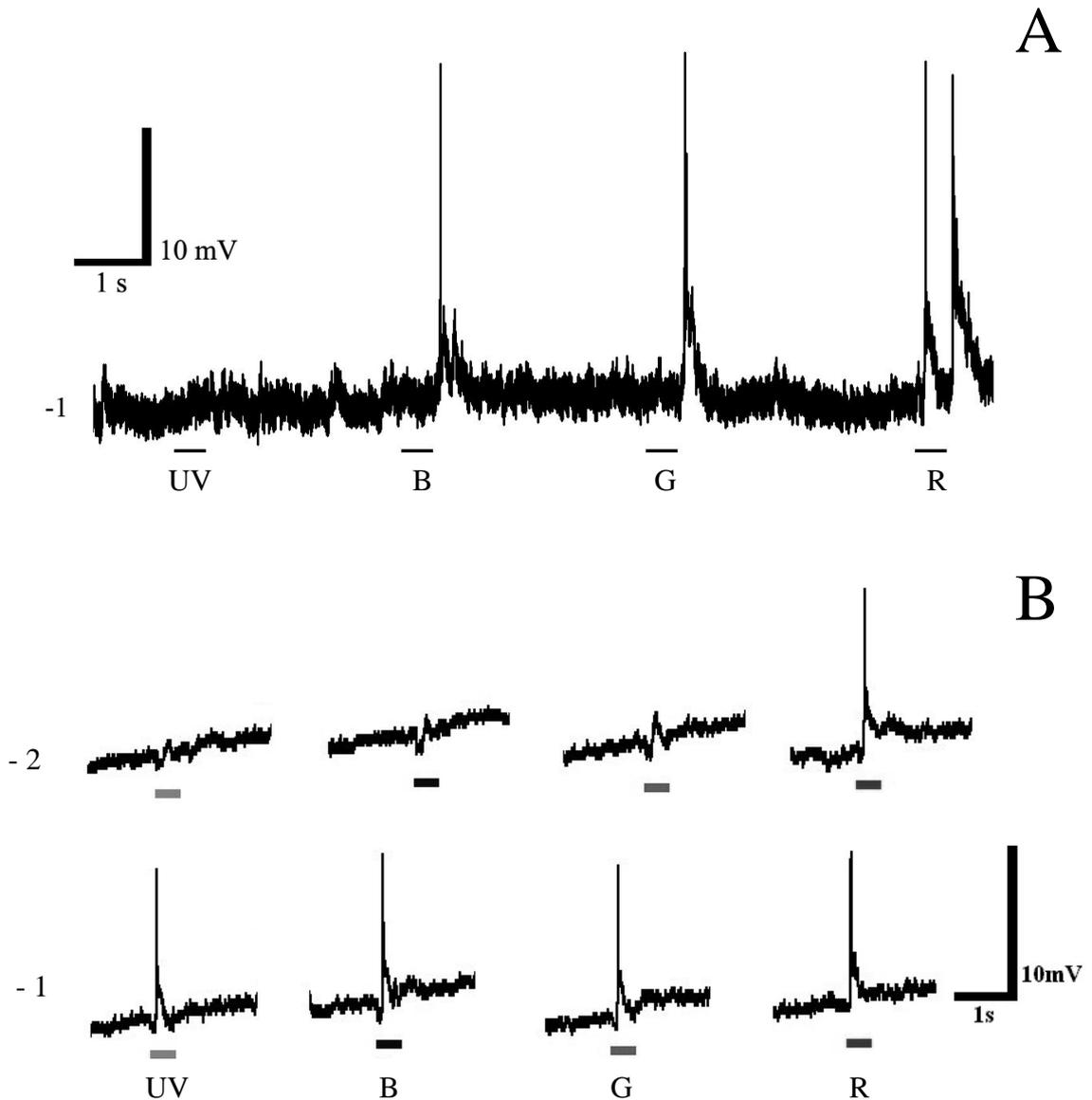


Figura 10. Registros de duas células ganglionares aos estímulos 370 (UV), 450 (B), 540 (G) e 640 nm (R). (A) Registro da célula T25RC2 obtido a partir da estimulação da central do campo receptivo com estímulos circulares ($\emptyset = 700 \mu\text{m}$ de diâmetro) no nível máximo de intensidade ($-1 \log$) (B) Registros da célula T16RC7 obtidos a partir da estimulação da central do campo receptivo com estímulos circulares ($\emptyset = 700 \mu\text{m}$ de diâmetro) em dois diferentes níveis de intensidade (-2 e $-1 \log$). Apenas na intensidade média a resposta cromática é observada.

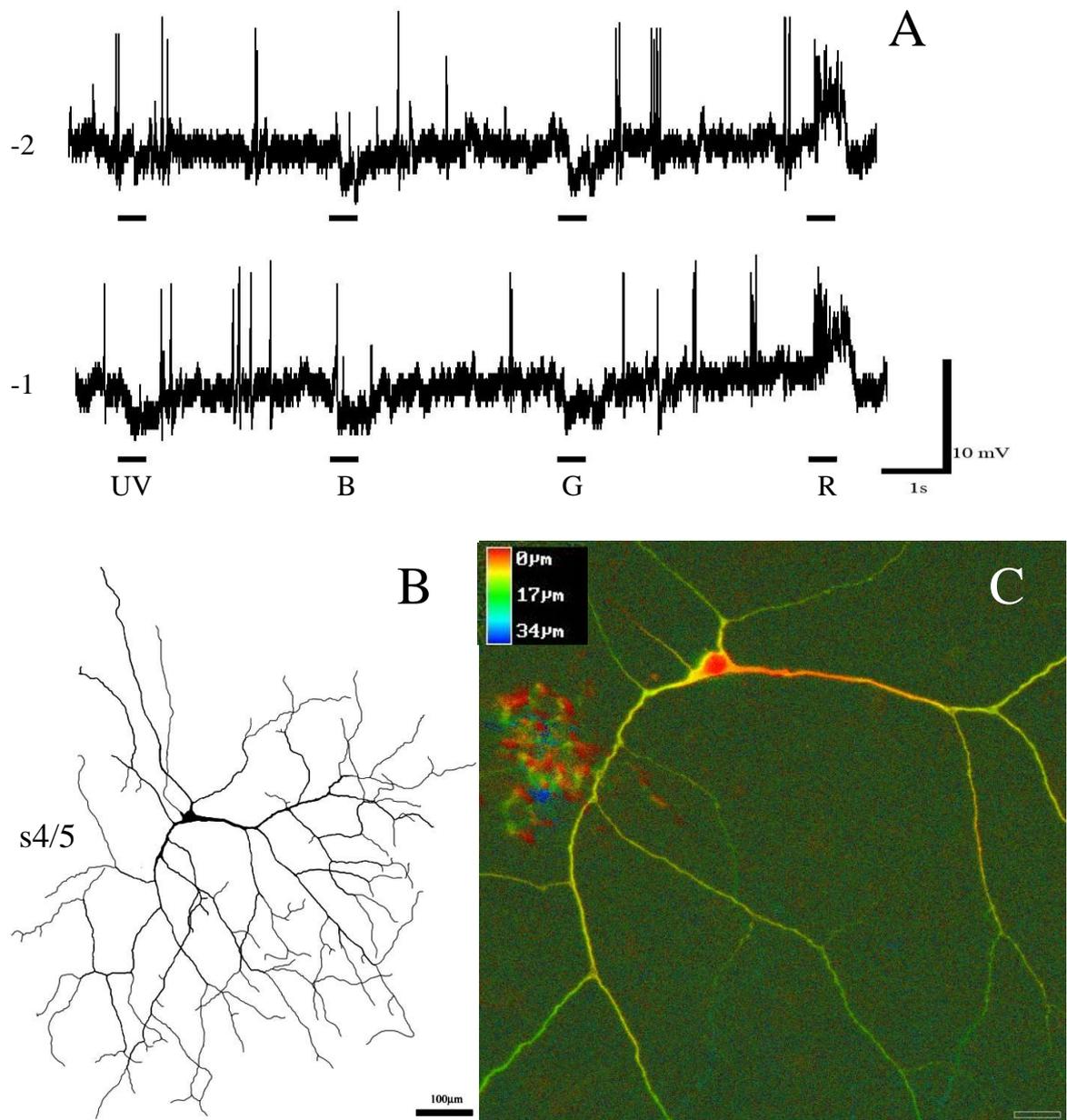


Figura 11. Registro intracelular e morfologia da célula ganglionar (T35RC1) identificada como G21. (A) Registros obtidos a partir da estimulação da central do campo receptivo com estímulos circulares ($\varnothing = 700 \mu\text{m}$ de diâmetro) nas intensidades de -2 e -1 log. Estímulos: 370 (UV), 450 (B), 540 (G) e 640 nm (R). (B) Desenho esquemático da célula, com estratificação na camada s5 (escala = $100 \mu\text{m}$). (C) Reconstrução bidimensional da célula ganglionar, onde nota-se apenas um nível de estratificação da célula baseado na escala de cor.

3.1.2. Células Ganglionares com Oponência Cromática UVBG+ R-

Oponência cromática antagônica à descrita nas células acima, foi registrada em uma célula ganglionar (T14L C2). Nesta célula foi realizado o paradigma de estimulação $V\text{-log } I$ com estímulos circulares de 700 μm de diâmetro (Figura 12). Na menor intensidade (-3 log) nota-se uma nítida oponência das entradas verde (excitatória) e vermelha (inibitória), os estímulos UV e azul não alteraram o padrão de disparo da célula nesta intensidade. Na intensidade intermediária luz vermelha promove vigorosa hiperpolarização sustentada na célula, enquanto que os estímulos UV azul e verde despolarizam a célula. Na intensidade mais alta de teste a oponência cromática UVBG+ R- é nitidamente observada no registro.

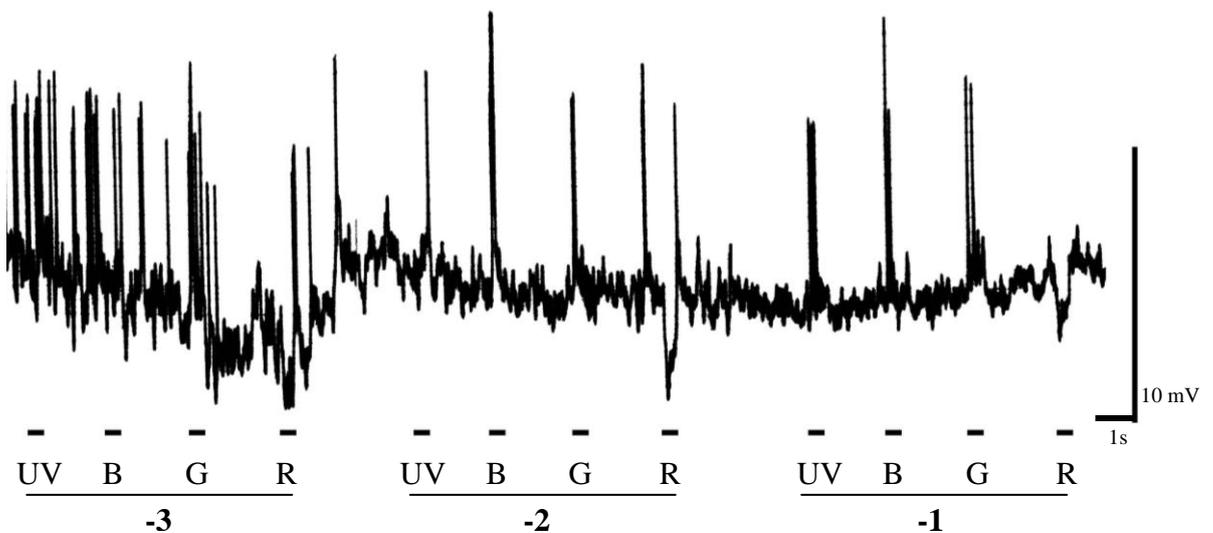


Figura 12. Registros intracelulares de uma célula ganglionar (T14LC6) aos estímulos 370 (UV), 450 (B), 540 (G) e 640 nm (R), em três níveis de intensidade e diâmetro de 700 μm . A oponência UVBG+L- ocorre nas intensidades média e alta no centro do campo receptivo.

Mais duas células com oponência UVBG+R- são mostradas na figura 13. A célula T49RC1 respondeu com oponência quando estimulada com estímulos circulares (300 μm) nas intensidades baixa e média (Figura 13A). Outra célula de mesma oponência espectral é mostrada na figura 13B, a oponência cromática apenas foi observada quando estímulos anulares foram realizados.

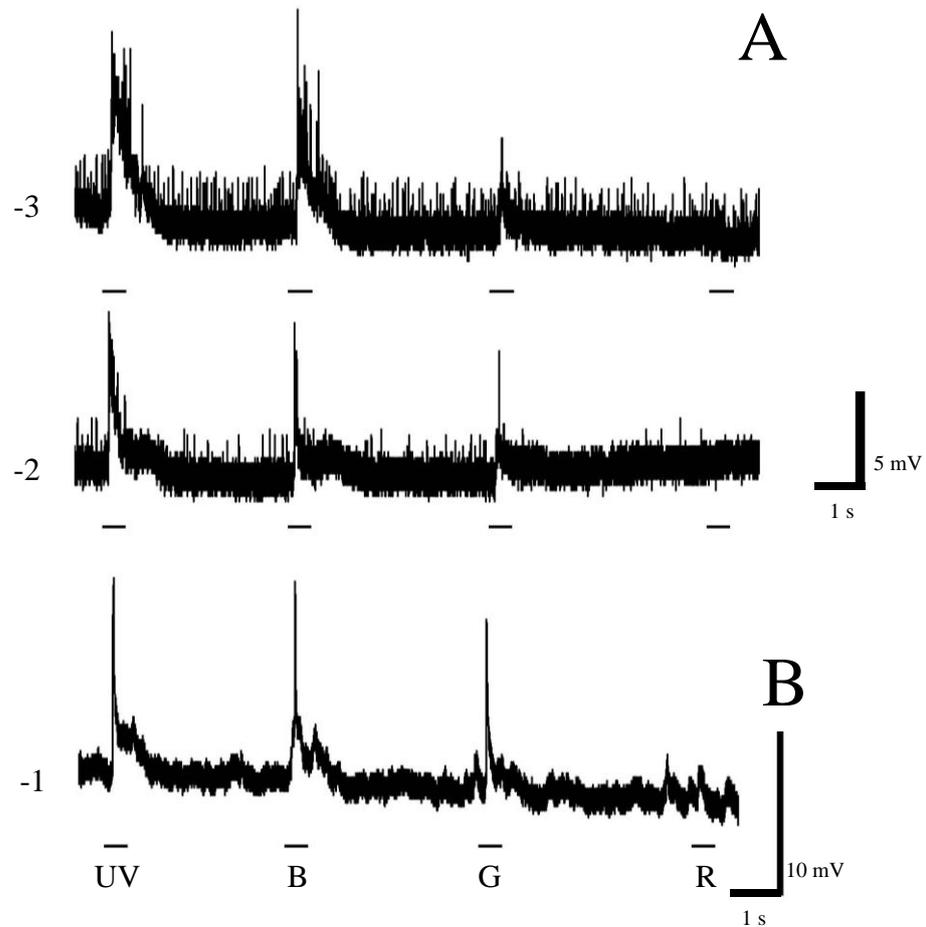


Figura 13. Registros intracelulares de duas células ganglionares aos estímulos 370 (UV), 450 (B), 540 (G) e 640 nm (R), em diferentes níveis de intensidade e formas do estímulo. (A) registros obtidos na célula (T49RC1) no centro do campo receptivo com estímulos circulares ($\varnothing= 300 \mu\text{m}$) nas intensidades baixa (-3 log) e média (-2 log). (B) Registros obtidos da célula (T49RC5) a partir da estimulação da periferia do campo receptivo com estímulos anulares ($\varnothing= 1500/1050 \mu\text{m}$) na maior intensidade (-1 log).

3.1.3. Células Ganglionares com Oponência Cromática UV+ BGR-

No resultado anterior observamos células que tinham oponência cromática entre um extremo do espectro, no caso luz vermelha, contra o restante do espectro de luz (UV, azul e verde). Uma situação semelhante, porém envolvendo agora a outra extremidade do espectro, foi encontrada em duas células ganglionares registradas. O perfil das respostas é mostrado na figura 14, onde temos uma célula com oponência espectral do tipo UV+ BGR-.

A estimulação de baixa intensidade (-3 log) nos quatro comprimentos de onda não produziu mudança na taxa de disparo da célula em relação ao repouso. Sob intensidade média uma nítida oponência é observada entre as duas regiões extremas do espectro de luz (UV e vermelho), as quais produziram respostas despolarizantes e hiperpolarizantes, respectivamente. Na intensidade mais alta a oponência cromática entre o estímulo UV, o qual novamente altera o padrão de disparo da célula ganglionar com um aumento sustentado na frequência de disparo, e o restante do espectro: luz azul, verde e vermelha, estímulos que produziram hiperpolarizações sustentadas.

Na figura 15, temos a segunda célula ganglionar com oponencia cromática do tipo UV+BGR-. Na figura apresentamos inicialmente as respostas ao teste *Vlog* com diâmetro do estímulo de 700 μm (Figura 15A), e o mesmo teste com ânulos para estimulação da periferia do campo receptivo (Figura 15B). Na primeira situação de teste (15A), na intensidade baixa os estímulos não alteram significativamente o comportamento da célula; contudo na intensidade média observa-se sob estimulação no UV uma resposta despolarizante sustentada na célula durante o estímulo seguido de um componente também sustentado hiperpolarizante no apagar da luz. Situação inversa é observada para os estímulos azul verde e vermelho, ou seja hiperpolarização sustentada na presença do estímulo e despolarização na retirada dos estímulos. O comportamento da célula foi diferente no campo receptivo periférico: a apresentação de um anel de luz UV azul de baixa intensidade (-3 log) produziu resposta excitatória, seguida de um

componente hiperpolarizante sustentado na retirada dos estímulos, enquanto anéis de luz verde e vermelho resultaram em resposta inibitória (UVB+ GR-). Na intensidade média (-2 log) a codificação cromática da célula é mantida, contudo podemos notar um aumento na atividade da célula nos estímulos azul e vermelho. Na intensidade mais alta a resposta cromática da célula foi perdida.

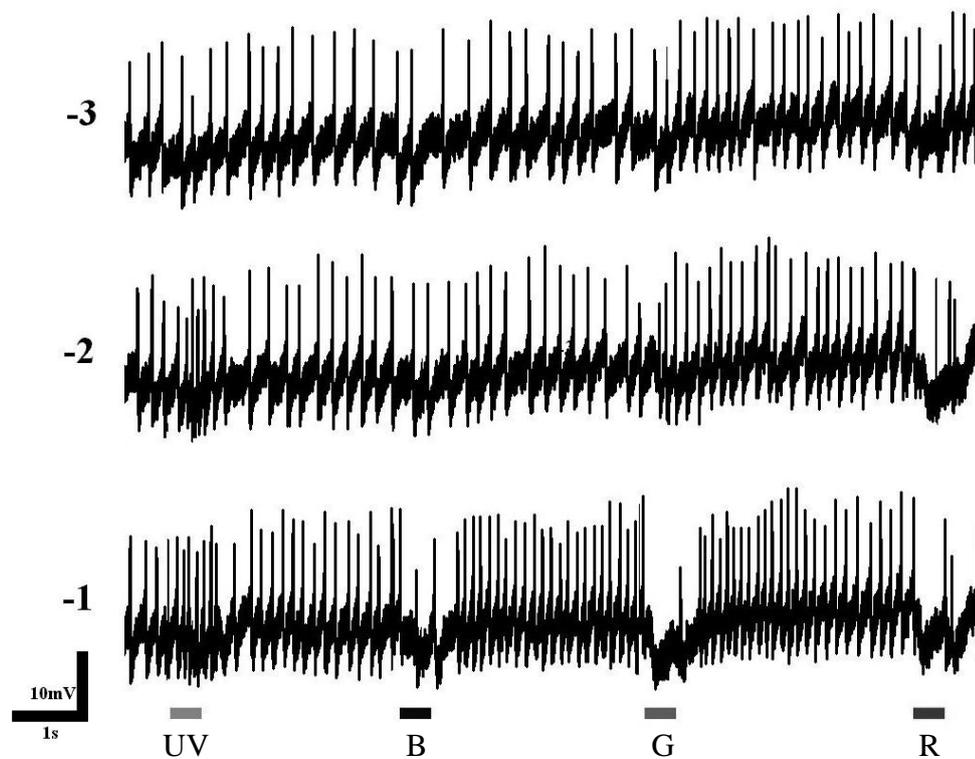


Figura 14. Registros intracelulares de uma célula ganglionar (T27RC5) aos estímulos 370 (UV), 450 (B), 540 (G) e 640 nm (R), em três níveis de intensidades (-3, -2, -1 log). Registros obtidos a partir da estimulação central do campo receptivo com estímulos circulares ($\varnothing = 700 \mu\text{m}$).

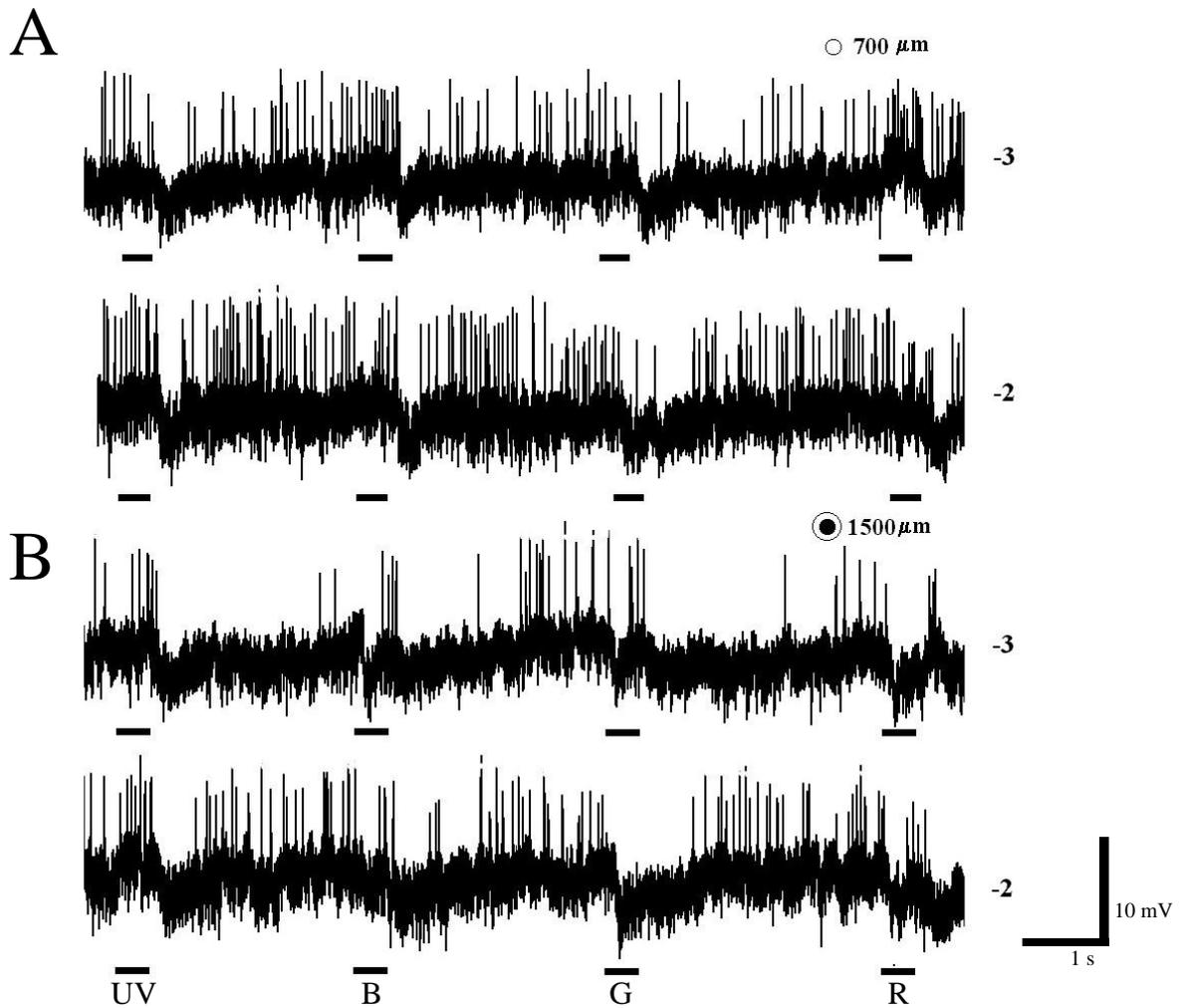


Figura 15. Registros intracelulares de uma célula ganglionare aos estímulos 370 (UV), 450 (B), 540 (B) e 640 nm (R), em diferentes níveis de intensidade e formas do estímulo. (A) registros obtidos a partir da estimulação central do campo receptivo com estímulos circulares ($\emptyset = 700 \mu\text{m}$) nas intensidades baixa (-3 log) e media (-2 log). (B) Registros obtidos a partir da estimulação da periferia do campo receptivo com estímulos anulares ($\emptyset = 1500/1050 \mu\text{m}$) nas intensidades baixa (-3 log) e media (-2 log).

3.1.4. Células Ganglionares com Oponência Cromática BGR+ UV-

Duas células ganglionares apresentaram oponência BGR+ UV- (antagônica ao código das células anteriores). Comportamento dependente da intensidade do estímulo foi observado na célula T42LC2 (Figura 16). Na intensidade mais baixa a célula comporta-se com uma oponência do tipo UV+ BGR-. Curiosamente, com o aumento da intensidade (-2 e -1 log) a célula tem um comportamento opoente inverso, ou seja, do tipo BGR+ UV-, com o estímulo de 300 μm . Aumentando o diâmetro do estímulo para 700 μm notamos na intensidade de -3 log uma oponência do tipo GR+UVB- a qual se mantém nas outras intensidades testadas (-2 e -1). Quando esta célula foi estimulada na periferia do campo receptivo não houve oponência cromática: neste caso a célula respondeu com despolarizações para todos os comprimentos de onda. Esta célula ao final dos registros foi injetada e sua morfologia revelada. É uma célula ganglionar de porte pequeno, com cerca de 14 μm de área de corpo celular e 230 μm de campo dendrítico. Analisando a estratificação desta célula em microscopia confocal, observamos uma estratificação nas sublâminas s1 e s4/5. Esta célula foi identificada com sendo do tipo G24.

Outra célula ganglionar (T15RC3) registrada apresentou oponência espectral do tipo BGR+ UV- (Figura 17), em resposta a estímulos centrais (700 μm) com intensidade máxima. A célula respondeu com despolarização transiente aos estímulos azul, verde e vermelho.

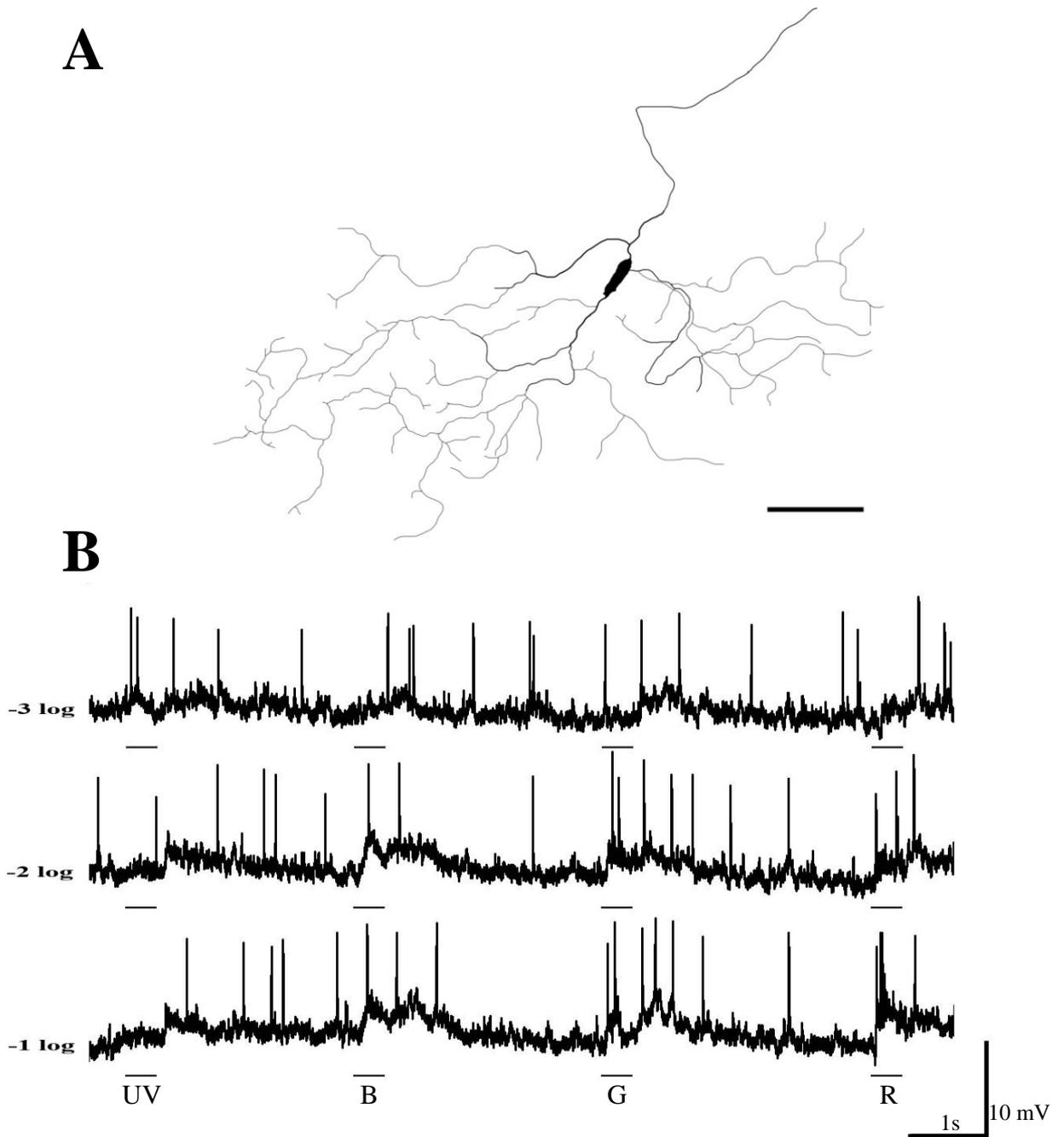


Figura 16. Desenho esquemático e registro de uma célula ganglionar (T42LC2) classificada como BGR+UV- aos estímulos 370 (UV), 450 (B), 540 (G) e 640 nm (R). (A) Desenho esquemático da célula identificada como G24, nessa célula identificamos estratificação nas sublâminas s1 e s4/5 (escala = 25 μ m). (B) Registros obtidos a partir da estimulação da central do campo receptivo com estímulos circulares ($\varnothing = 300 \mu$ m) em três diferentes níveis de intensidade (-3, -2 e -1 log).

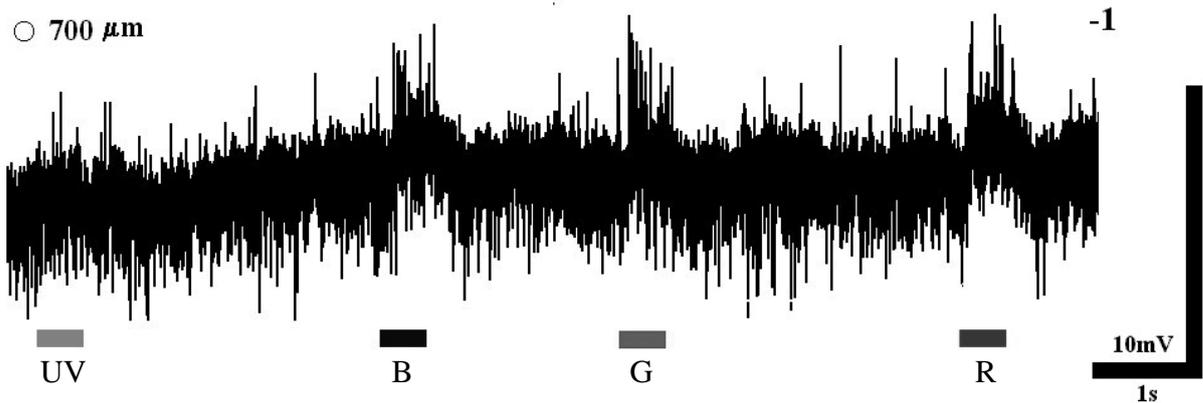


Figura 17. Registro intracelular uma célula ganglionar (T15RC3) aos estímulos 370 (UV), 450 (azul), 540 (verde) e 640 nm (vermelho). Registros obtidos a partir da estimulação da central do campo receptivo com estímulos circulares ($\varnothing = 700 \mu\text{m}$) com intensidade máxima de estimulação ($-1 \log$).

3.1.5. Células Ganglionares com Oponência Cromática GR+ UVB-

O tipo de oponência espectral mais encontrado neste estudo foi GR+UVB, observado em sete diferentes células ganglionares. Contudo, algumas destas células também apresentaram respostas cromáticas complexas que variaram com a intensidade do estímulo.

Um exemplo de variação do tipo da resposta com a intensidade está ilustrado na figura 18, onde mostramos o perfil das respostas de uma célula ganglionar oponente (T21RC2). Na coluna da esquerda mostramos as respostas a estímulos circulares em três intensidades. Sob baixa e média intensidade a célula ganglionar tem características de uma célula OFF com respostas hiperpolarizantes sustentadas para todos os comprimentos de onda. Na intensidade mais alta estímulos UV e azul novamente promovem uma resposta hiperpolarizante da célula; contudo, a célula responde com despolarização quando estímulos verde e vermelho são apresentados, caracterizando a resposta GR+ UVB-. Quando o mesmo tipo de teste é feito; contudo, com os estímulos na forma de anéis a célula tem uma resposta

hiperpolarizante para o UV e azul, e rápidas respostas despolarizantes para a luz verde e vermelha na mais baixa intensidade dos estímulos apresentados. Uma mudança de otonência cromática na intensidade média, com uma resposta despolarizante sustentada para a luz UV, e respostas hiperpolarizantes para os estímulos azul, verde e vermelho (UV+ BGR-). Curiosamente, a célula volta a responder com otonência do tipo GR+ UVB-, quando os estímulos são apresentados na intensidade máxima. Esta célula foi injetada com neurobiotina após o registro intracelular; sua morfologia está ilustrada na figura 18. Esta célula tem 22,5 µm de diâmetro de corpo celular e 600 µm de diâmetro de árvore dendrítica e com estratificações em s4/5 e s2.

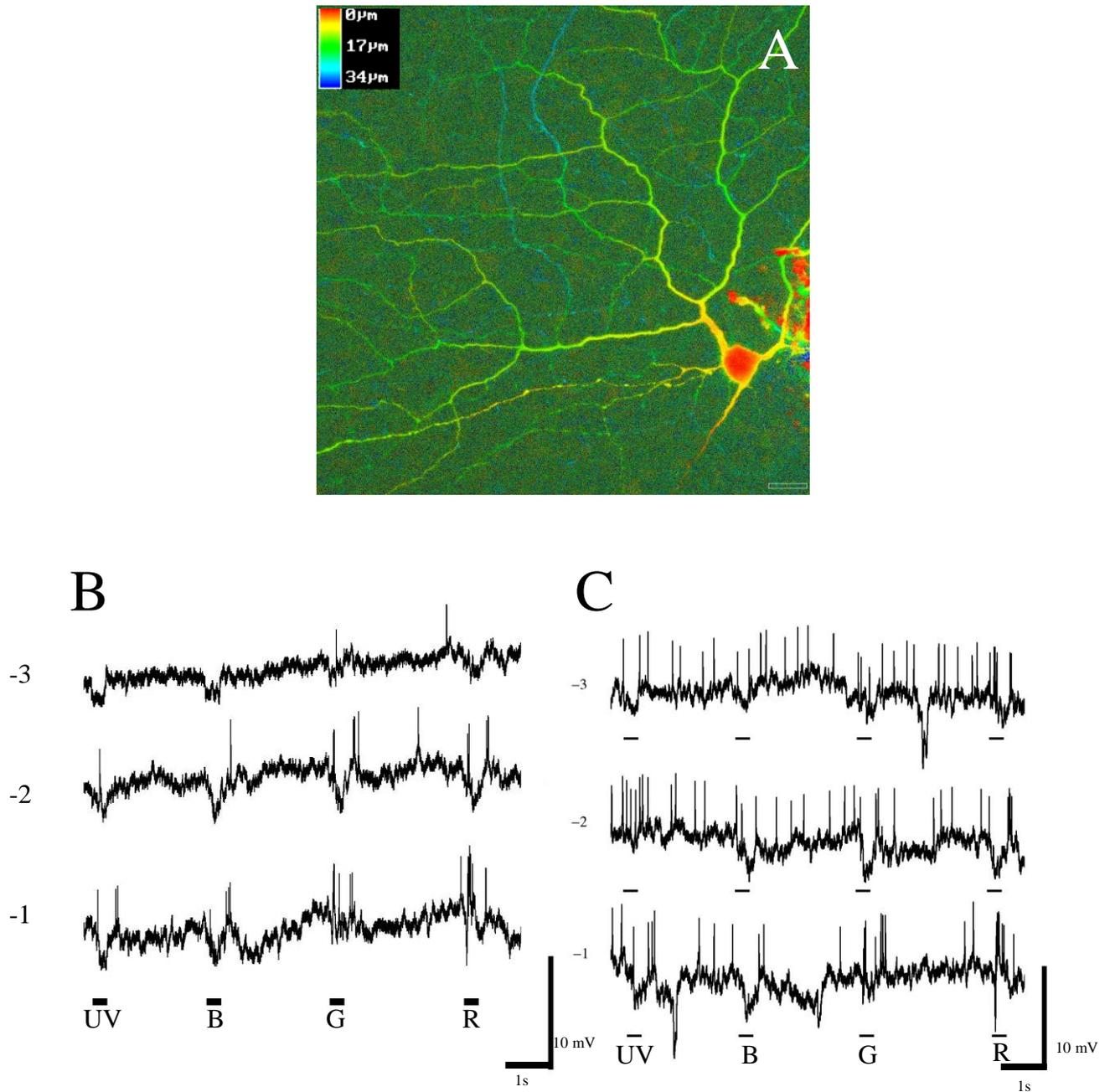


Figura 18. Morfologia e registros intracelulares da célula ganglionar (T21RC2) aos estímulos 370 (UV), 450 (B), 540 (G) e 640 nm (R). (A) Reconstrução bidimensional da célula ganglionar onde podemos observar os dendritos representados com cores diferentes, o que indica indiretamente diferentes níveis de estratificação, neste caso s2 (azulado) e s4/5 (esverdeado) (escala = 25 μm). (B) registros obtidos da estimulação central do campo receptivo ($\varnothing = 700 \mu\text{m}$). (C) Registros obtidos a partir da estimulação da periferia do campo receptivo com estímulos anulares ($\varnothing = 1500/1050 \mu\text{m}$) nas intensidades três intensidades.

Na figura 19 mostramos outro exemplo de uma célula com oponência do tipo GR+ UVB-; na figura apresentamos apenas dois níveis de intensidade de estímulos na forma de círculos (Figura 19A) e anéis (Figura 19B). Em ambos os casos notamos que na intensidade média a célula é hiperpolarizada para os estímulos UV, azul e verde e excitada no estímulo vermelho; enquanto que na intensidade mais alta luzes verde e vermelha passam a excitar a célula no acender, e apagar dos estímulos; luz UV novamente promove uma hiperpolarização residual da célula enquanto que na retirada do estímulo azul um componente despolarizante pode ser observado.

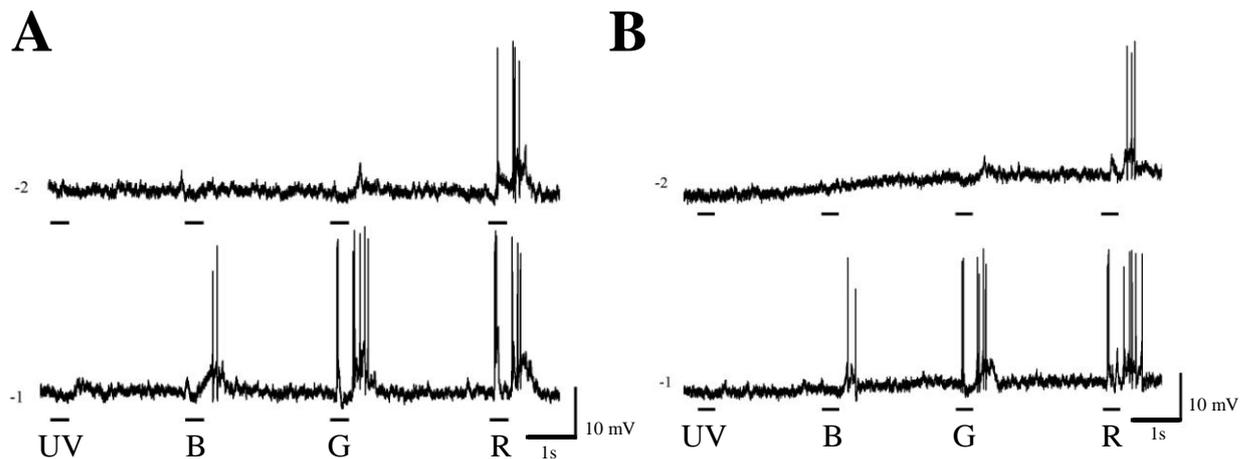


Figura 19. Registros intracelulares de uma célula ganglionar (T23RC3) aos estímulos 370 (UV), 450 (azul), 540 (verde) e 640 nm (vermelho). (A) registros obtidos da estimulação central do campo receptivo ($\emptyset = 700 \mu\text{m}$) nas intensidades -2 e -1 log. (B) Registros obtidos a partir da estimulação da periferia do campo receptivo com estímulos anulares ($\emptyset = 1500/1050 \mu\text{m}$) nas intensidades de -2 e -1 log.

Outra célula com oponencia cromática do tipo GR+UVB- foi injetada com sucesso e sua morfologia pode ser analisada. Na figura 20 mostramos uma imagem de uma reconstrução desta célula, produzida com um microscópio confocal. A célula tem densa ramificação dendrítica a qual estartifica em três sublâminas identificadas como s1/2, 2/3 e 3/4 níveis de estratificação (triestratificada). A morfologia desta célula é correspondente com a célula ganglionar classificada como G17 (AMMERMULLER AND KOLB, 1995). A oponencia cromática foi obtida sob estimulação de máxima intensidade.

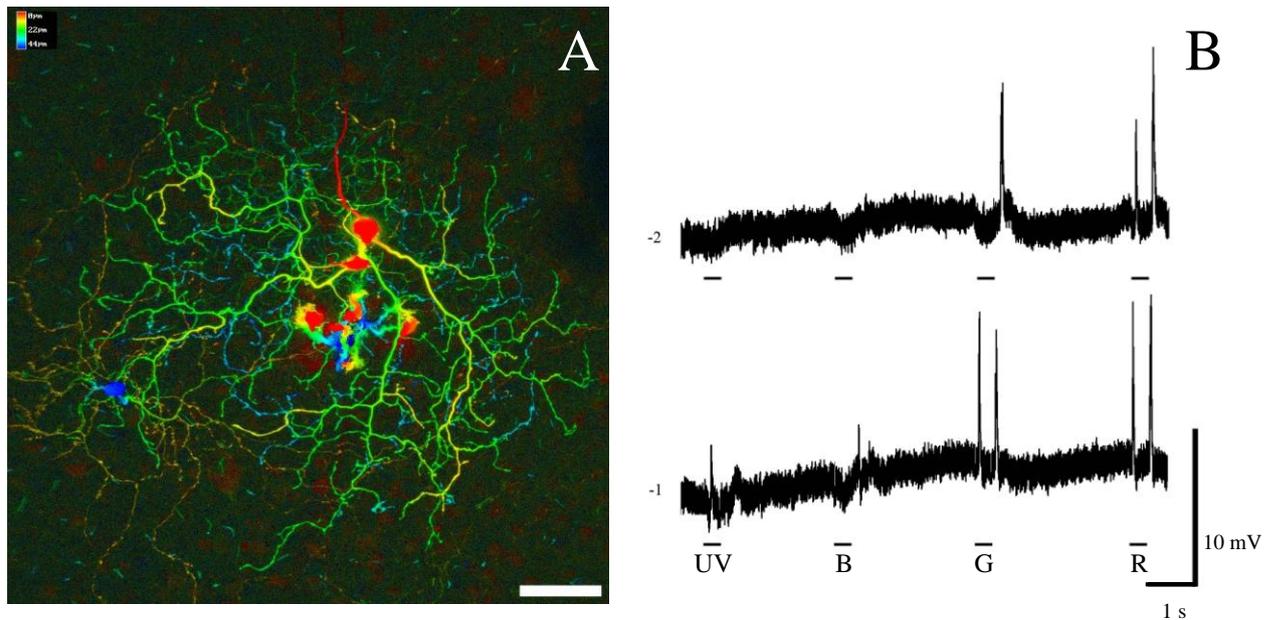


Figura 20. Morfologia e registros intracelulares de uma célula ganglionar (T27RC8) aos estímulos 370 (UV), 450 (B), 540 (G) e 640 nm (R). (A) Reconstrução bidimensional da célula ganglionar identificada como G17 (escala = 25 μ m). (B) registros obtidos da estimulação central do campo receptivo (\varnothing = 700 μ m) nas intensidades -2 e -1 log.

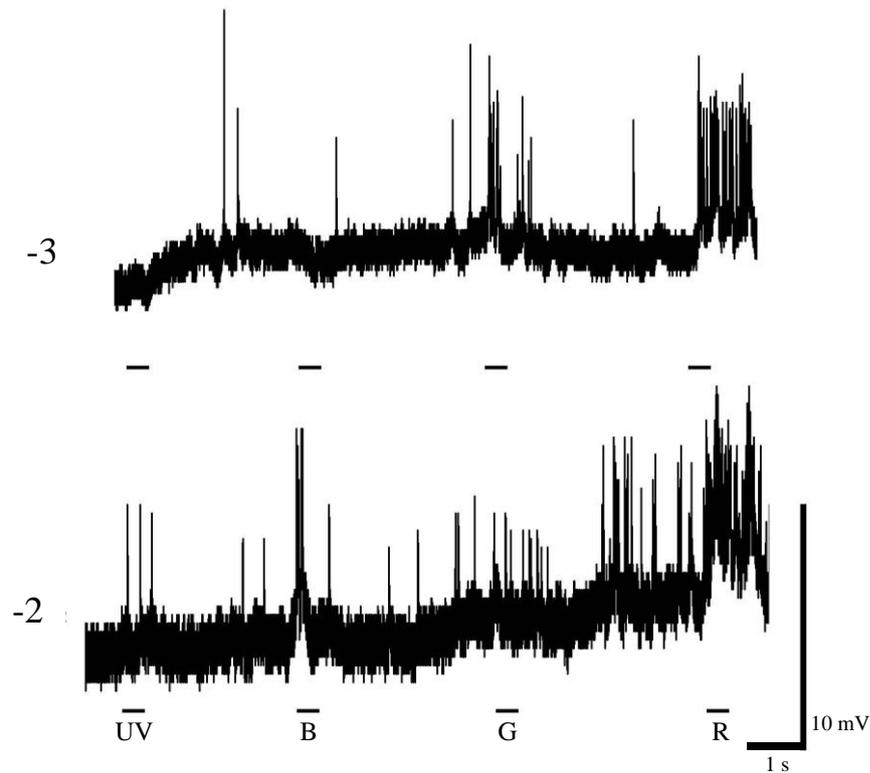


Figura 21. Registros intracelulares de uma célula ganglionar (T49RC3) aos estímulos 370 (UV), 450 (B), 540 (G) e 640 nm (R). Registros obtidos da estimulação central do campo receptivo ($\varnothing = 300 \mu\text{m}$) nas intensidades -3 e $-2 \log$.

3.1.6. Células Ganglionares com Oponência do Tipo UVB+ GR-

A célula T40RC1 (Figura 22) apresentou dupla oponência entre o centro e a periferia do campo receptivo: com estímulos circulares de média e alta intensidade a célula respondeu com aumento na frequência de disparo quando a luz vermelha foi ligada; contrariamente luz verde aboliu o disparo da célula, estímulos UV e azul foram pouco efetivos no comportamento nestes testes. Contudo, com estímulos anulares na intensidade máxima de teste estímulos UV e azul promoveram aumento sustentado no disparo da célula; luz verde novamente inibiu de maneira transiente a resposta da célula e luz vermelha produziu

resposta hiperpolarizante sustentada na célula, caracterizando a célula com oponência do tipo UVB+ GR- na periferia do campo receptivo.

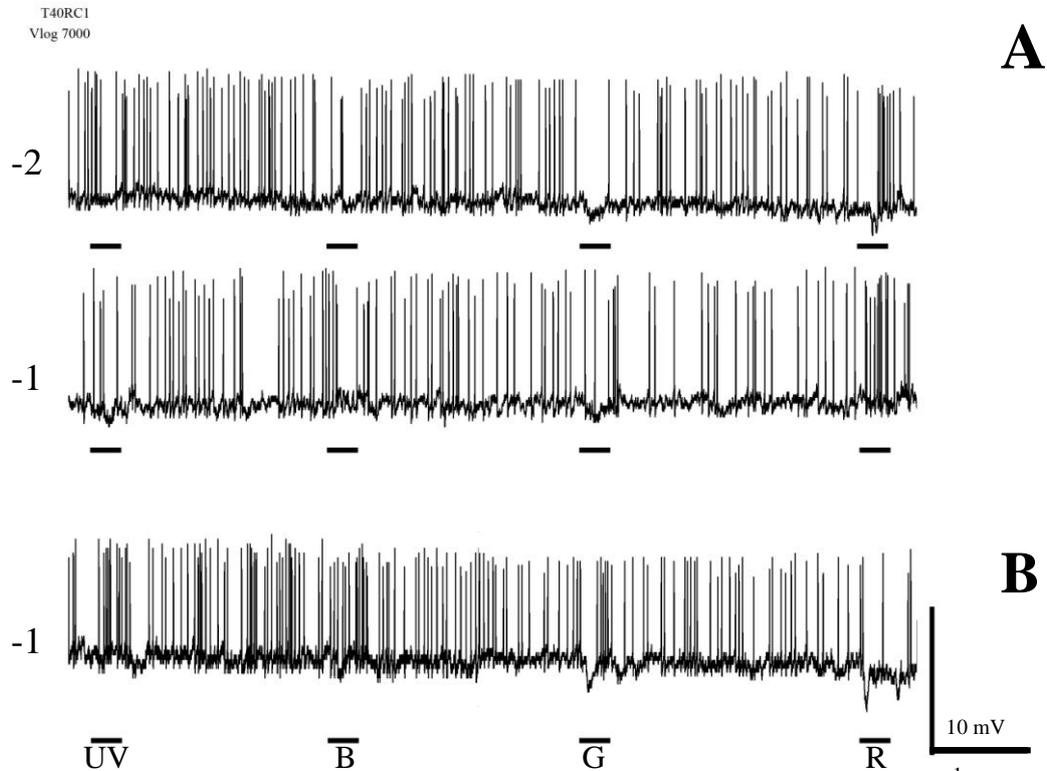


Figura 22. Registro intracelular da célula ganglionar T40RC1 com dupla ^{1s} oponência cromática. (A) Estímulos centrais ($\varnothing = 700 \mu\text{m}$) promovem respostas R+ UVBG- na maior intensidade (-1 log). (B) Estímulos periféricos ($\varnothing = 1500/1050 \mu\text{m}$) nas intensidade de -1 log a célula respondeu com oponencia UVB+ GR-.

3.1.7. Células Ganglionares com Oponências Antagônicas (B+ UVGR- vs UVGR+ B-)

Duas das células ganglionares registradas tiveram combinações cromáticas completamente antagônicas, sendo elas do tipo B+ UVGR- e UVGR+ B-. O primeiro tipo de oponência (B+ UVGR-) é mostrado na figura 23A encontrado na célula T05LC4. Na figura, notamos que estímulos verde e vermelho inibiram a descarga espontânea prévia, enquanto, estímulos UV diminuíram a frequência dessa descarga e o estímulo azul aumentou a

frequência de disparo da célula. O mesmo padrão foi observado com as duas intensidades testadas. Esta célula foi perdida antes da finalização do teste e não foi possível a realização dos testes na intensidade mais alta.

Na figura 23B, uma combinação oposta (UVGR+ B-) é mostrada. Nesta célula (T15RC1) obtivemos resposta apenas na intensidade mais alta; nas outras intensidades testadas não houve resposta. Contudo percebemos que estímulos UV, verde e vermelho promovem uma despolarização transiente rápida e um potencial de ação na célula quando apresentados. Por outro lado, uma pequena resposta hiperpolarizante transiente é observada quando a luz azul é apresentada.

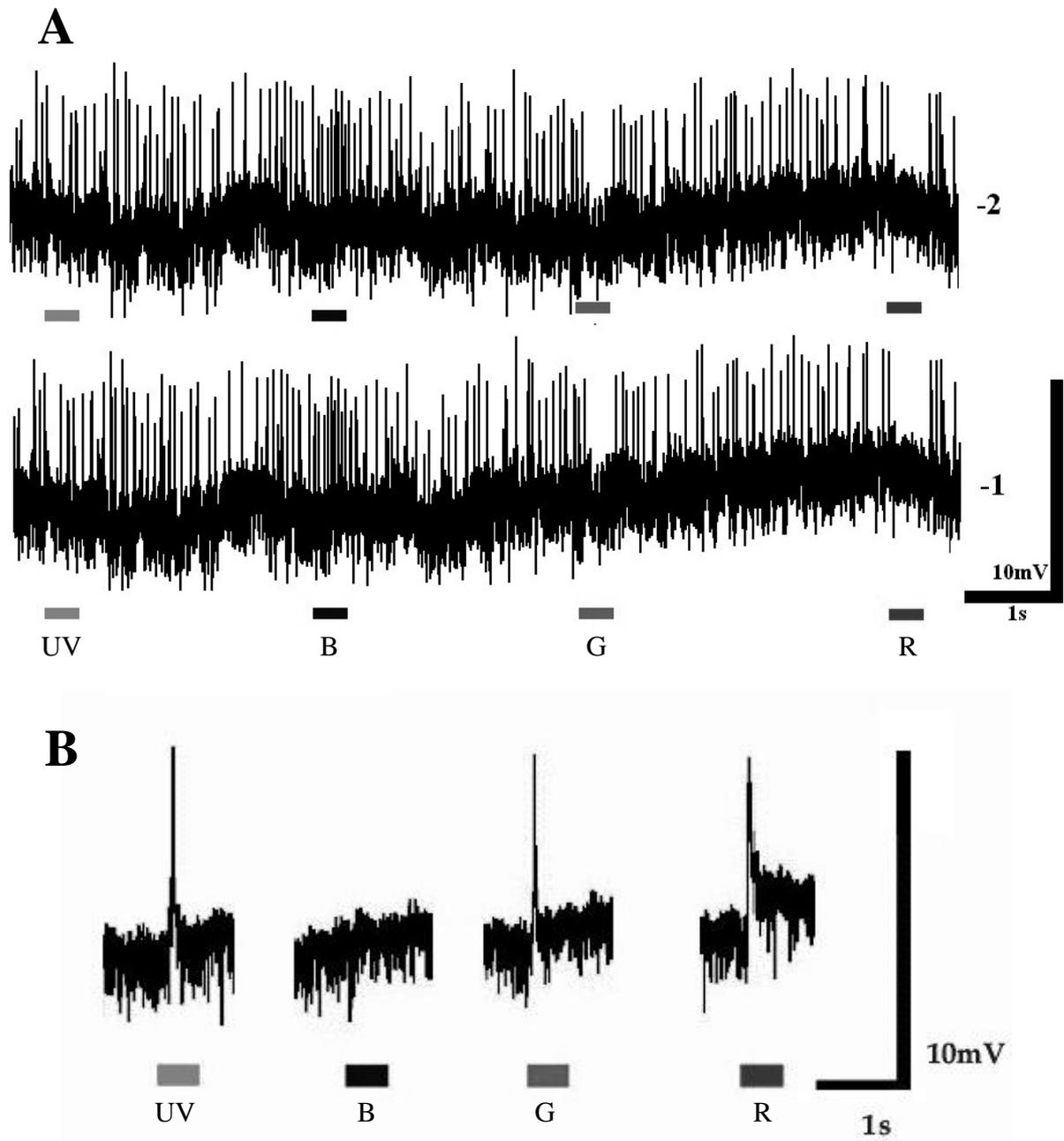


Figura 23. Respostas de duas células ganglionares com oponências antagônicas (B+ UVGR- versus UVGR+ B-). (A) registros obtidos da estimulação central do campo receptivo ($\emptyset = 700 \mu\text{m}$) nas intensidades -2 e -1 log. (B) Registros obtidos a partir da estimulação da central do campo receptivo com estímulos anulares ($\emptyset = 700 \mu\text{m}$) nas intensidade de -1 log.

3.1.8. Célula Ganglionar com Oponência BG+ UVR-

Uma nítida mudança no comportamento celular é observada na célula T41LC3. Com estímulos de 700 mm de diâmetro, no centro do campo receptivo a célula responde com inibição aos dois extremos do espectro (UV e R, Figura 24A). Aumentando-se a intensidade de luz a resposta inibitória aparece mais claramente para os outros estímulos, e na intensidade mais alta de teste um comportamento tipo de uma célula OFF é observado, com a célula sendo inibida em todos os comprimentos de onda. Nesta célula oponência cromática foi observada apenas na periferia do campo receptivo (Figura 24B). Nesta região, quando a menor intensidade foi utilizada para as luzes de teste a célula comportou-se como sendo uma célula R+UVBG-; com o aumento da intensidade inibição na resposta é observada nos extremos do espectro (UV e R); na região do azul nenhuma alteração significativa é observada, contudo um aumento na atividade é observado no estímulo verde. A célula novamente muda o seu comportamento com o aumento da intensidade. Na intensidade mais alta a célula é excitada na presença do estímulo azul e inibida no UV verde e vermelho. Nesta célula fizemos ainda outro tipo de testagem na qual estímulos de mesma intensidade e mesmo comprimento de onda são apresentados com a variação no tamanho do diâmetro do estímulo (Figura 24C). No menor diâmetro de teste podemos observar respostas excitatórias na região do UV, B e G, e uma inibição na região do vermelho, com o aumento gradativo do diâmetro dos estímulos respostas inibitórias são observadas para o UV, G e R, contudo na região do azul na presença do estímulo notamos a excitação transiente da célula seguida de um componente inibitório sustentado.

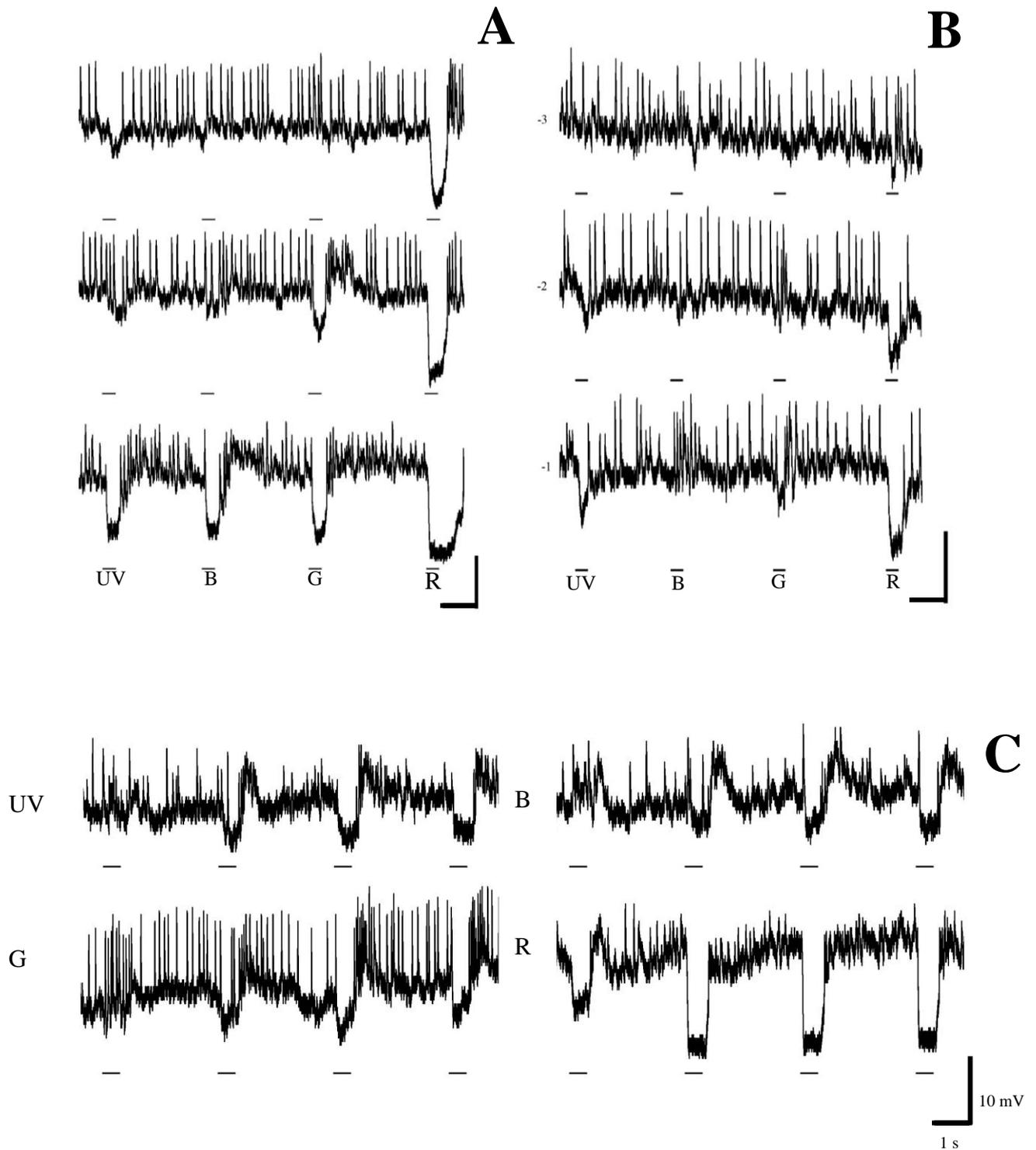


Figura 24. Registros intracelulares de uma célula ganglionar (T41LC3) aos estímulos 370 (UV), 450 (B), 540 (G) e 640 nm (R). (A) Registros obtidos da estimulação central do campo receptivo ($\emptyset = 700 \mu\text{m}$) nas três intensidades. (B) Registros obtidos a partir da estimulação da periferia do campo receptivo com estímulos anulares ($\emptyset = 1500/1050 \mu\text{m}$) nas três intensidades. (C) respostas a círculos de diferentes diâmetros (*Íris* ver métodos).

3.1.9. Célula Ganglionar com Oponência UVGR+ B-

Com estímulos no centro do campo receptivo e diâmetro de 300 μm , na menor intensidade de teste, a célula T42RC2 respondeu com oponência cromática do tipo UVGR+ B- (Figura 25). Com o aumento da intensidade da luz de teste a célula perdeu a propriedade de oponência, respondendo com hiperpolarizações para todos os comprimentos de onda nas intensidades média e alta. No teste com um diâmetro de 700 μm nenhuma resposta foi registrada; contudo, quando a periferia do campo receptivo foi estimulada oponência cromática do tipo GR+ UVB- foi observada na maior intensidade da luz de teste.

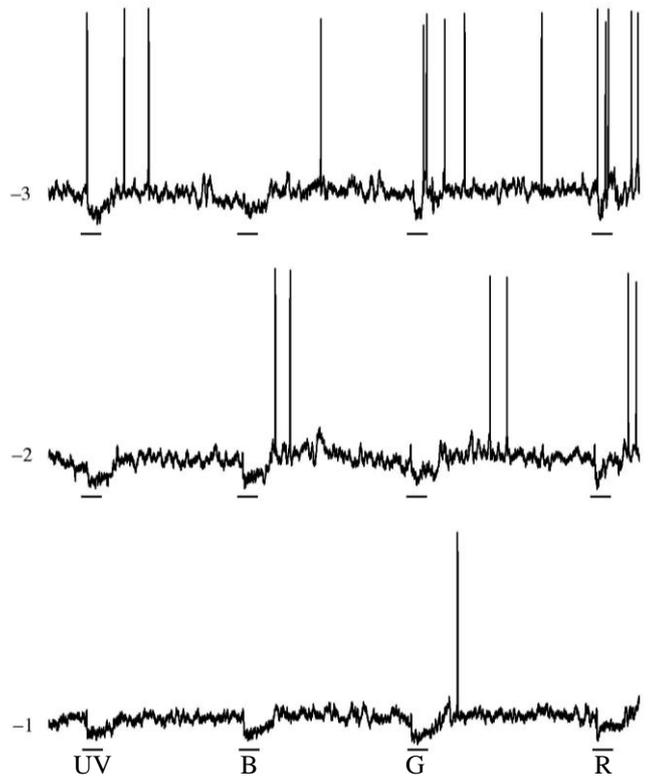


Figura 25

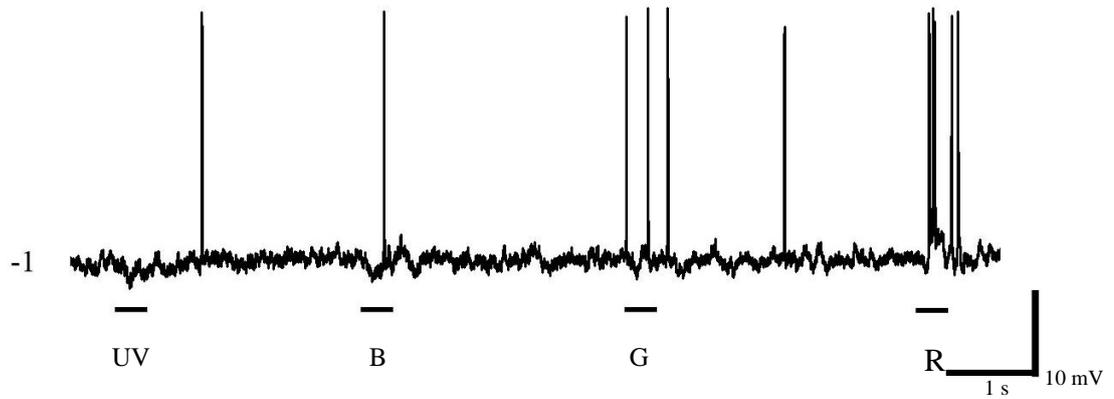


Figura 25. Registros intracelulares de uma célula ganglionar (T42RC2) com dupla otonência. (A) Registros obtidos da estimulação central do campo receptivo ($\varnothing = 700 \mu\text{m}$) nas intensidades três intensidades. (B) Registros obtidos a partir da estimulação da periferia do campo receptivo com estímulos anulares ($\varnothing = 1500/1050 \mu\text{m}$) na intensidades de $-1 \log$.

3.1.10. Célula Ganglionar com Oponência UVR+BG-

Oponência espectral do tipo UVR+BG- foi encontrado em uma célula ganglionar. Na figura 26A, apresentamos a seqüência de estímulos nas três intensidades de teste. Na intensidade mais baixa, nenhuma alteração é observada no potencial de repouso da célula. Na intensidade média um pequeno componente excitatório é observado na presença da luz UV e no apagar das luzes verde e vermelha a célula responde com uma atividade despolarizante; na intensidade mais alta observamos uma resposta oponente do tipo UVR+BG-, com componentes despolarizantes tanto no acender quanto no apagar dos estímulos UV e R, o mesmo tipo de comportamento é observado apenas no apagar dos estímulos azul e verde. Nesta célula foi feita uma série espectral (Figura 26B) para observarmos o espectro de ação na maior intensidade, com estímulos de 700 μm de diâmetro com passos de 40 nm entre os estímulos. Nota-se resposta ao apagar do estímulo na faixa de comprimentos de onda curtos e médios e resposta on-off nos comprimentos de onda longos, a partir de 620 nm.

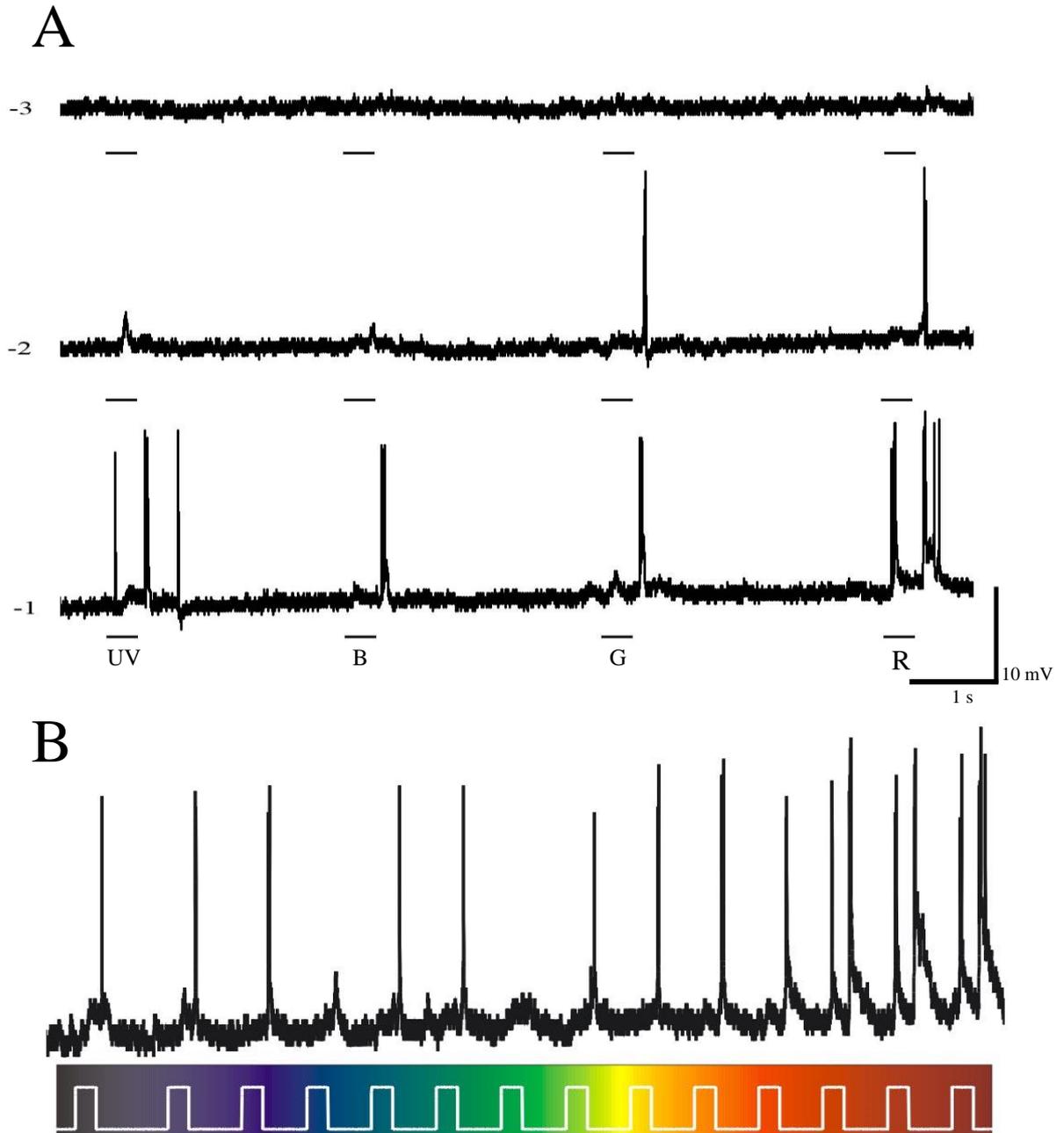


Figura 26. Registros intracelulares de uma célula ganglionar (T47LC2). (A) Registros obtidos da estimulação central do campo receptivo ($\varnothing = 300 \mu\text{m}$) nas intensidades três intensidades. (B) Série espectral realizada com círculos de 1500 de diâmetro em passos de 40 nm entre os estímulos na intensidade de $-1 \log$.

3.1.11. Célula Ganglionar com Oponência UVG+ BR-

Oponência do tipo UVG+ BR- foi observada em apenas uma célula ganglionar. Com estímulos circulares de 300 μm de diâmetro em baixa intensidade (-3 log) a célula apresenta inibição nas regiões do azul e vermelho com uma resposta sustentada na presença da luz verde, e pequena despolarização na luz UV. Na intensidade média respostas despolarizantes sustentadas são observadas na presença dos estímulos UV e verde, estímulos azul e vermelho, contudo inibem a célula. Na maior intensidade a célula perde a característica de uma célula cromática respondendo como uma célula OFF (Figura 27).

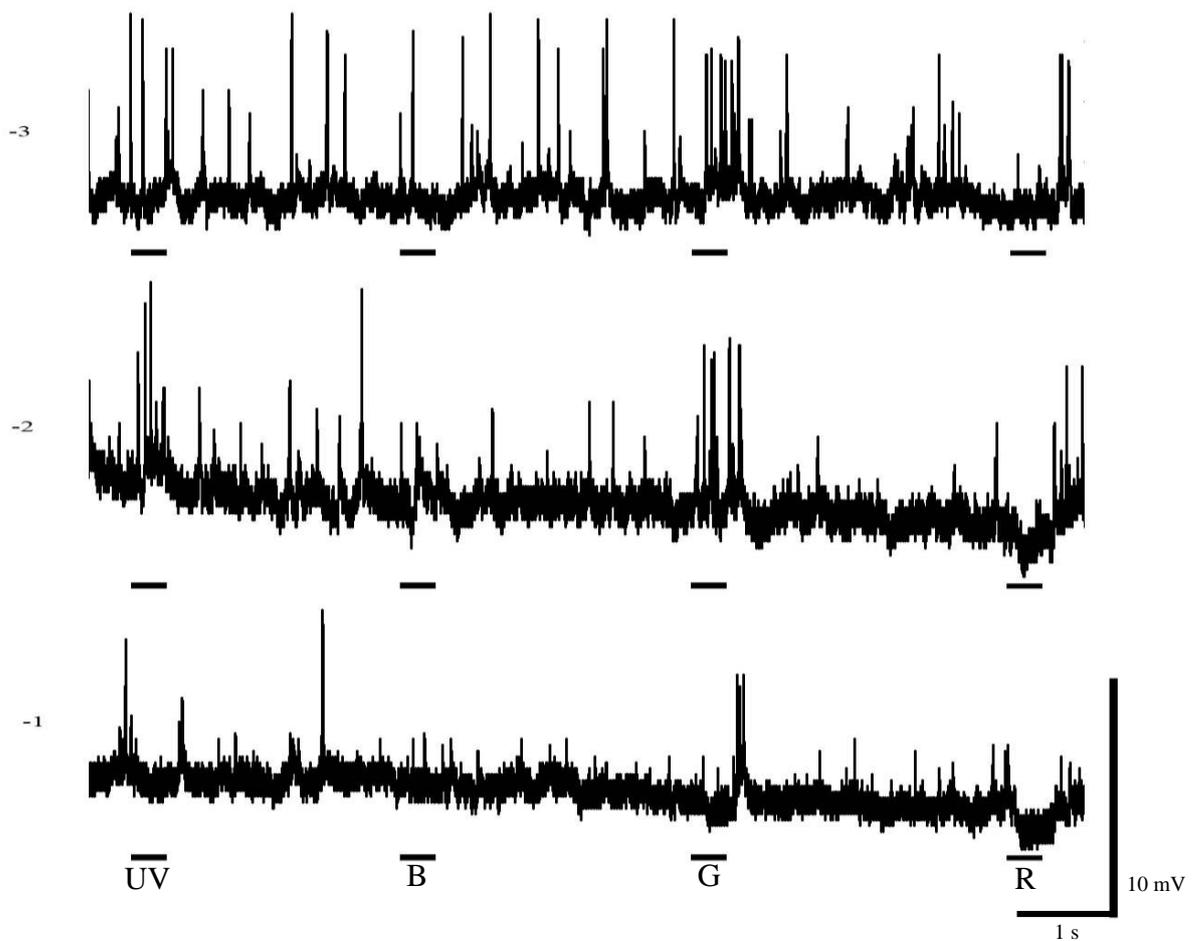


Figura 27. Registros intracelulares de uma célula ganglionar (T50RC). Registros obtidos da estimulação central do campo receptivo ($\varnothing = 300 \mu\text{m}$) nas intensidades três intensidades.

3.2. CÉLULAS AMÁCRINAS Oponentes

O número de células amácrinas oponentes encontradas foi muito inferior ao número de células ganglionares, $\approx 5\%$ de células amácrinas contra $\approx 15\%$ de células ganglionares do total de neurônios registrados nesse estudo. Entre as células amácrinas foram registradas quatro diferentes tipos de oponentências cromáticas encontradas no centro do campo receptivo e na periferia. Respostas com componentes transientes foram os tipos mais comuns encontrados entre as células amácrinas registradas neste estudo. Contudo, foram também muito variáveis no curso temporal da resposta. Um resumo das respostas encontrado nas células amácrinas é apresentado na tabela 4.

Tabela 3. Tipos de Codificação de Cor.

Células Registradas		Tipos de Resposta			
Tipo Morfológico	<u>Registradas</u>	UV	Azul	Verde	Vermelho
	T5C5; T27C10; T19RC6; T46LC3	-	-	-	+
	T25C7; T43RC1	-	-	+	+
	T21C4; T21C3	-	+	+	+
A23b	T27C2; T32RC3	+	+	+	-

Legenda:

+ = Despolarização

- = Hiperpolarização

3.2.1. Célula Amácrina com Oponência Cromática R+ UVBG-

O primeiro tipo de oponência cromática encontrado em uma célula amácrina foi obtido com círculos de luz com intensidade média e alta. Na figura 28, apresentamos respostas de uma célula amácrina para duas intensidades testadas. Com intensidade média (-2 log de atenuação), podemos observar uma pequena resposta despolarizante transiente quando a luz vermelha foi acesa; resposta despolarizante com amplitude maior é observada quando a luz foi desligada. Para os outros comprimentos de onda testados, podemos observar apenas uma pequena resposta hiperpolarizante no UV e no verde quando os estímulos estão presentes, e um componente despolarizante quando o estímulo é retirado. Na intensidade mais alta (-1 log), podemos observar o componente despolarizante maior quando luz vermelha é ligada, assim como na retirada do estímulo, para os outros estímulos testados novamente um pequeno componente hiperpolarizante é observado com a presença do estímulo. Respostas despolarizantes com uma amplitude maior são observadas quando os estímulos são retirados. Assim esta célula foi classificada como R+UVBG-. Desafortunadamente, não foi possível fazer uma injeção intracelular nesta célula para posterior classificação morfológica.

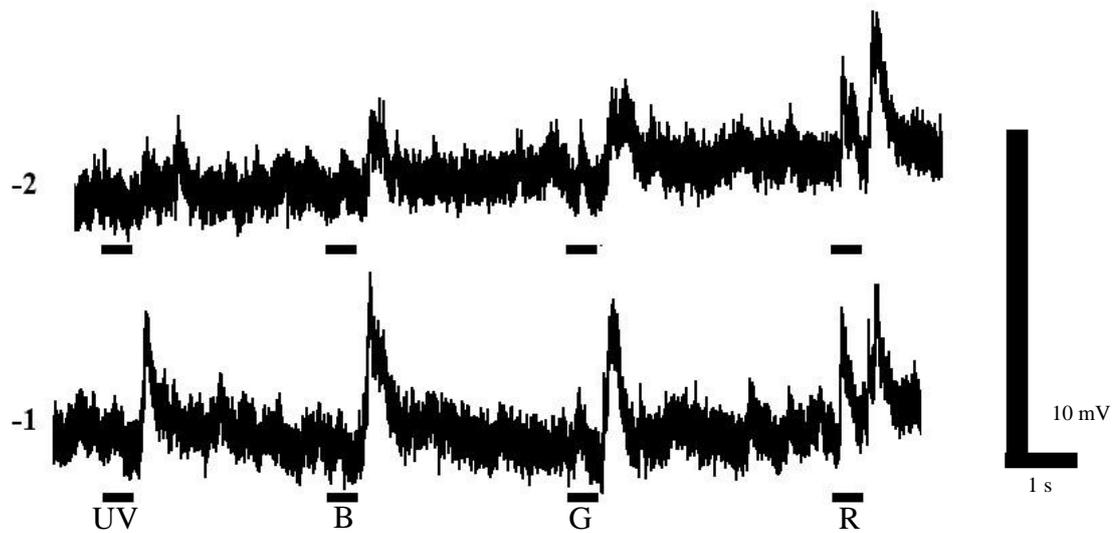


Figura 28. Registros intracelulares de uma célula amácrina (T05C5) aos estímulos 370 (UV), 450 (B), 540 (G) e 640 nm (R). Registros obtidos da estimulação central do campo receptivo ($\varnothing = 700 \mu\text{m}$) nas intensidades de -2 e -1 log.

Uma segunda célula amácrina registrada (T27RC10) apresentou oponência cromática do tipo R+UVBG- (Figura 29), contudo, o perfil das respostas variou em relação à mudança na intensidade dos estímulos. Na menor intensidade testada (coluna da esquerda) os estímulos UV e azul, provavelmente pela baixa intensidade dos estímulos, não produziram uma mudança significativa para uma classificação no potencial de repouso da célula, sob luz verde um pequeno componente hiperpolarizante é percebido. Luz vermelha produziu resposta despolarizante transiente quando acesa; o mesmo componente se repete ao apagar da luz. Sob intensidade média (coluna do meio) é confirmada a resposta transiente despolarizante no vermelho e também há resposta do mesmo tipo no verde. Respostas hiperpolarizantes são obtidas para os estímulos UV e azul. Estímulos na intensidade alta (coluna da direita) a célula responde com despolarizações transientes para todos os comprimentos de onda.

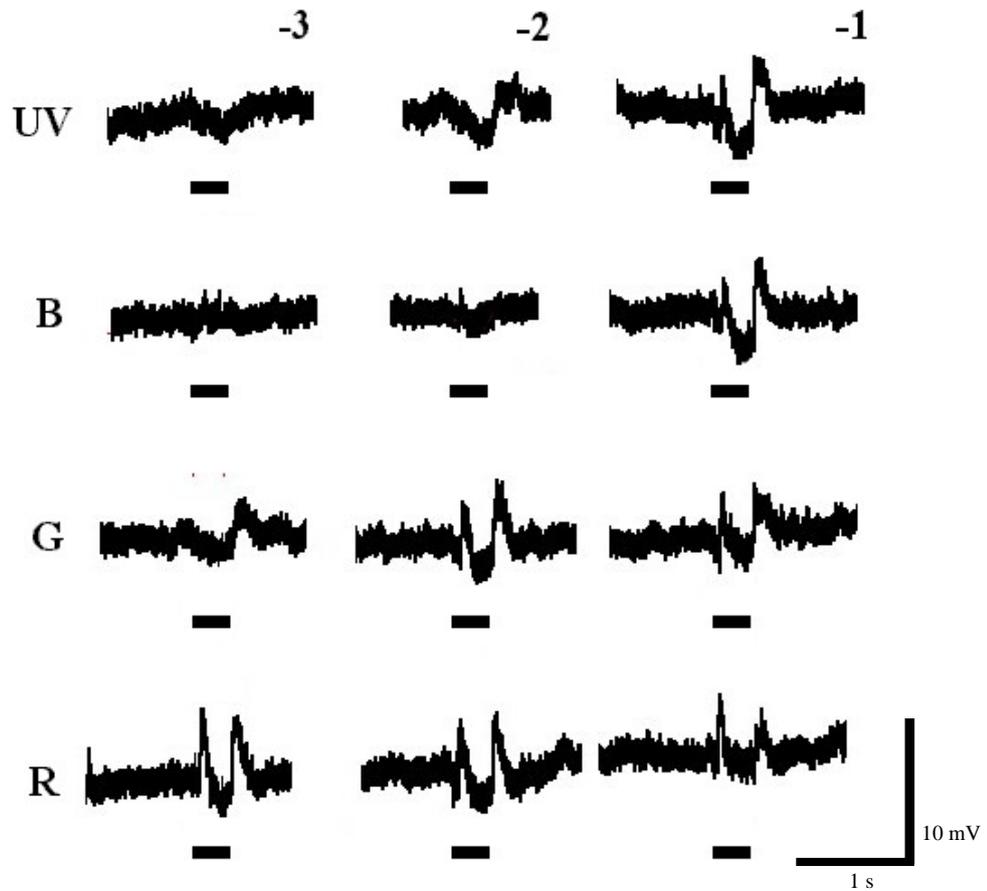


Figura 29. Registros intracelulares de uma célula amácrina (T27C10) aos estímulos 370 (UV), 450 (B), 540 (G) e 640 nm (R). Registros obtidos da estimulação central do campo receptivo ($\varnothing = 700 \mu\text{m}$) nas intensidades de -2 e -1 log.

3.2.2. Célula Amácrina com Oponência Cromática RG+ UVB

Um outro tipo de oponência cromática encontrada em uma célula amácrina (T25C7) foi o tipo RG+UVB-, mostrado na figura 30.

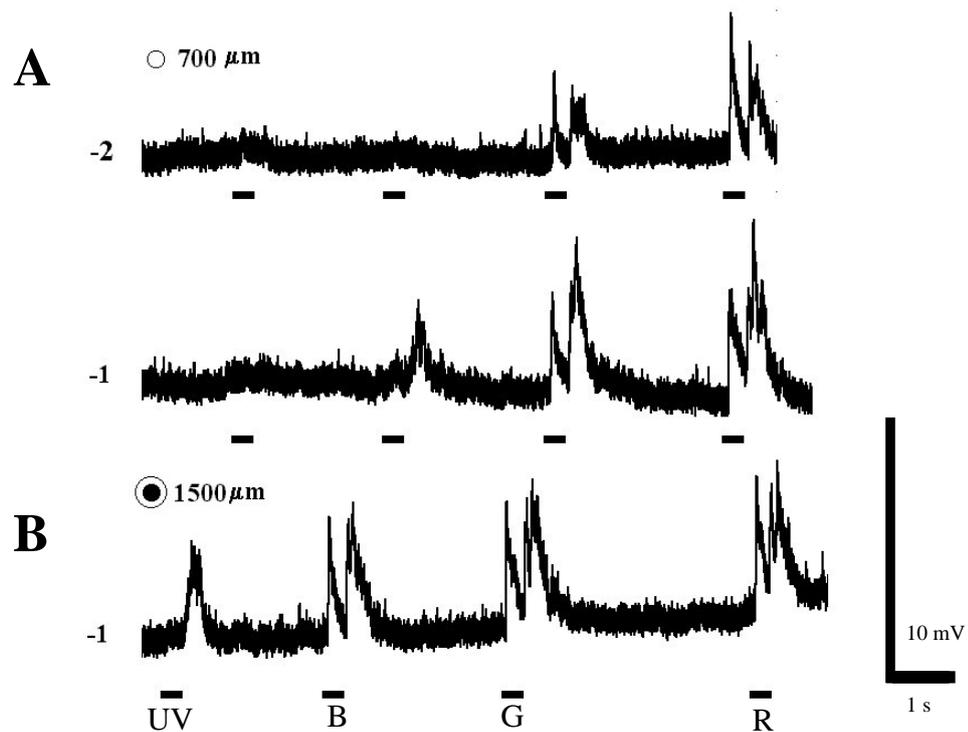


Figura 30. Registros intracelulares de uma célula amácrina (T25C7) aos estímulos 370 (UV), 450 (B), 540 (G) e 640 nm (R). (A) Registros obtidos da estimulação central do campo receptivo ($\varnothing = 700 \mu\text{m}$) nas intensidades de -2 e -1 log. (B) Registros obtidos a partir da estimulação da periferia do campo receptivo com estímulos anulares ($\varnothing = 1500/1050 \mu\text{m}$) na intensidades de -1 log.

Na menor intensidade não foi observado oponente em nenhum comprimento de onda testado. Na intensidade média luzes UV e azul não produziram nenhum tipo de alteração no potencial de repouso da célula (Figura 30A). Nesta intensidade luz verde e vermelha produziram despolarização transiente ON e OFF, de amplitude maior no ON do que no OFF em ambos os casos. Com o aumento da intensidade (-1 log) continua a não haver resposta no UV, mas passa a existir despolarização OFF com luz azul (Figura 30B). De maneira interessante, luz verde e vermelha novamente produziram respostas despolarizantes em situações ON e OFF; contudo, com uma relação inversa de magnitude à observada com a intensidade média, com uma maior resposta sob luz OFF. Nesta célula foram também testados anéis de luz para estimulação da periferia do campo receptivo da célula. Na figura 30C mostramos o resultado deste teste na maior intensidade testada. Luz UV produziu resposta OFF despolarizante. Os estímulos azul, verde e vermelho produziram respostas despolarizantes ON e OFF. Nesta situação experimental esta célula foi classificada como BGR+UV-.

3.2.3. Célula Amácrina com Oponência Cromática BGR+ UV-

Duas células amácrinas apresentaram respostas do tipo BGR+UV- (Figura 31), contudo novamente vamos observar uma não consistência, neste tipo de resposta com a variação da intensidade da luz. Na figura 31, mostramos as respostas de uma célula sob estimulação de média intensidade. Círculos de luz UV não produziram respostas da célula; círculos de luz azul, verde e vermelha produziram resposta ON-OFF. Na intensidade mais alta, a célula respondeu com despolarizações em todos os comprimentos de onda testados, comportando-se como uma célula ON-OFF.

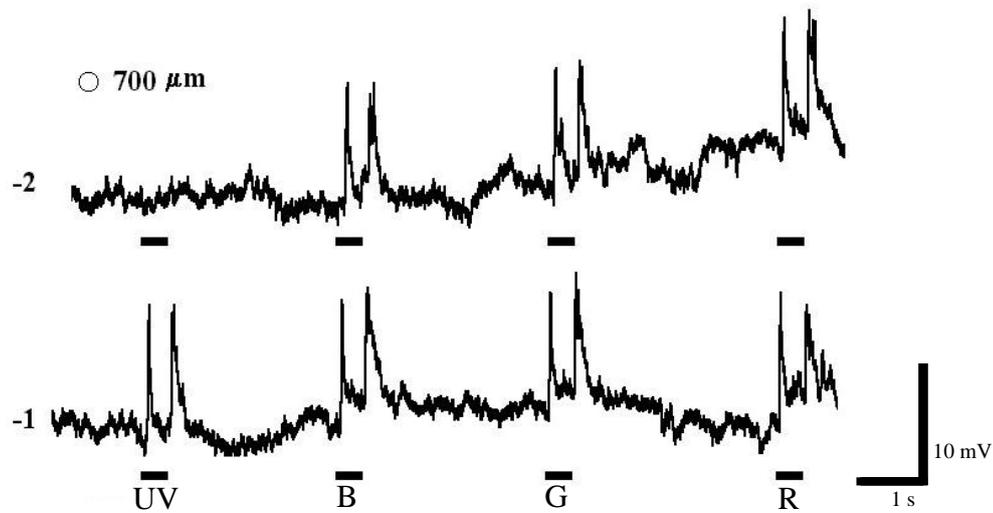


Figura 31. Registros intracelulares de uma célula amácrina (T21C4) aos estímulos 370 (UV), 450 (B), 540 (B) e 640 nm (R). Registros obtidos da estimulação central do campo receptivo ($\varnothing = 700 \mu\text{m}$) nas intensidades de -2 e -1 log.

3.2.4. Célula Amácrina com Oponência Cromática UVBG+R-

O ultimo tipo de oponência cromática em células amácrinas encontrado foi UVBG+R- na célula identificada como T27RC7. Na figura 32, mostramos o padrão de resposta nas três intensidades testadas, para os quatro comprimentos de onda. Na menor intensidade testada não houve alteração significativa do padrão de disparo da célula quando luz UV, azul e verde são ligadas; contudo houve abolição do disparo quando luz vermelha foi ligada. Na intensidade média houve despolarização transiente no acender da luz azul e verde; novamente luz UV não produz alteração significativa na resposta da célula e luz vermelha diminui o disparo da célula quando ligada. Na intensidade máxima componente transiente rápido aparece quando luz UV e azul são ligadas, luz verde produz uma resposta despolarização sustentada, e luz vermelha novamente abole a resposta da célula. Os testes com anéis de luz para estimulação da periferia do campo receptivo da célula não mostraram

oponência cromática, pois em todos os casos obtivemos apenas respostas OFF para todos os comprimentos de onda (não ilustrado). Esta célula também foi com sucesso injetada após a coleta das respostas cromáticas e sua morfologia foi revelada e analisada sob microscopia confocal. Na figura 32A, mostramos uma imagem digitalizada da célula amácrina injetada, trata-se de uma célula de grande porte, com morfologia de uma célula amácrina estrelada (“*stellate cell*”) com um campo dendrítico perfeitamente simétrico, com finos dendritos ramificando do corpo celular de maneira radial e estratificando na borda da sublâmina s2/3. Estas características morfológicas permitiram-nos classificá-la como do tipo A23b. Esta célula originalmente foi descrita (AMMERMULLER *et al.* 1995) com otonência do tipo BG+ R-; nosso resultado assim é semelhante ao descrito anteriormente, com a correção de sua otonência para o tipo UVBG+R-.

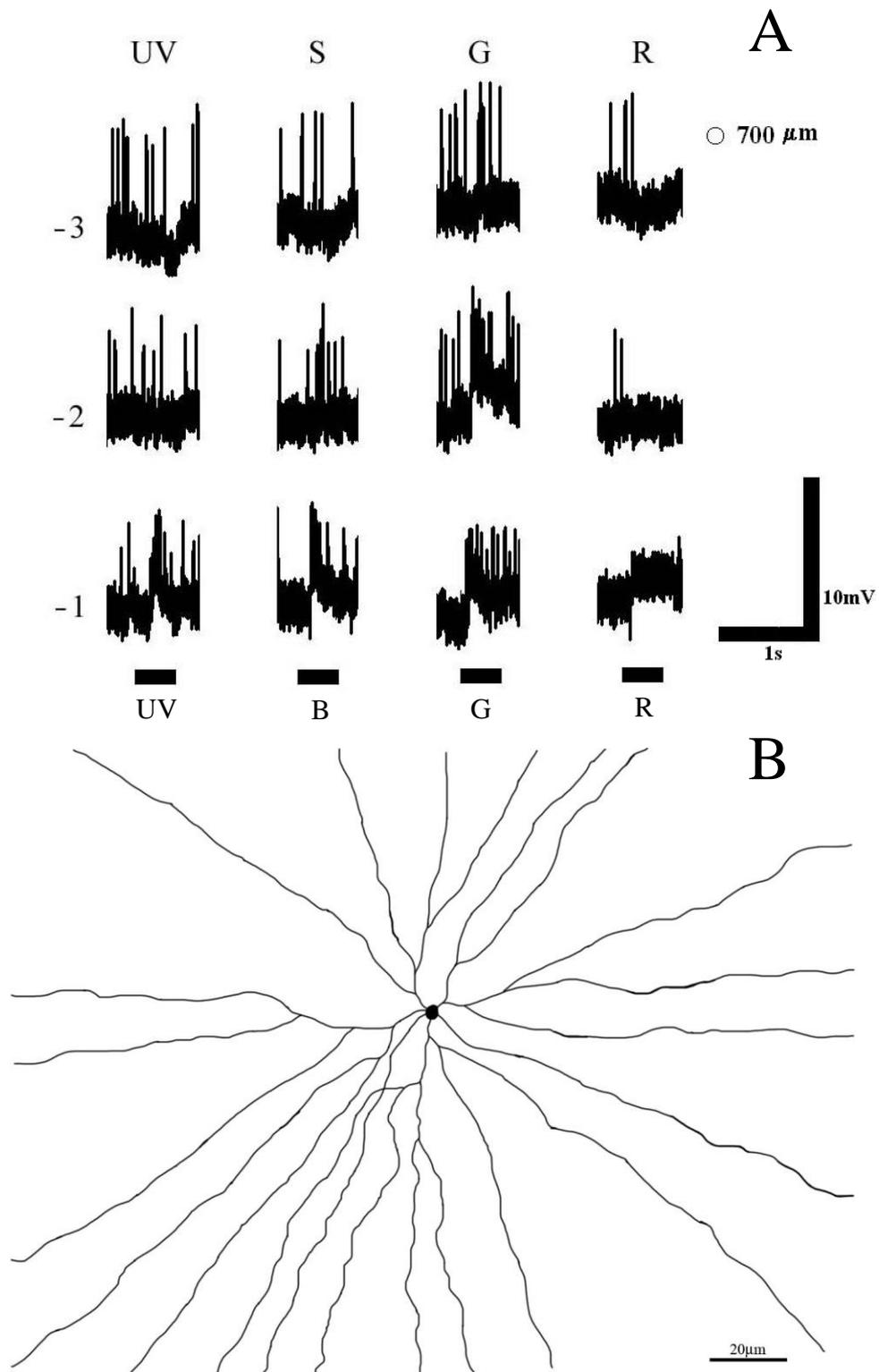


Figura 32. Micrografia e registros intracelulares de uma célula amácrina (T27C2) aos estímulos 370 (UV), 450 (B), 540 (G) e 640 nm (R). (A). registros obtidos da estimulação central do campo receptivo ($\varnothing = 700 \mu\text{m}$) nas três intensidades. (B) célula amácrina identificada como A23b com estratificação na sub-lâmina s2/3.

Oponência espectral do tipo UVBG+R- foi encontrada em outra célula amácrina (T32RC3), mas apenas na periferia do campo receptivo (Figura 33). Sob estimulação de círculos de 700 μm a célula respondeu com hiperpolarizações sustentadas em todos os comprimentos de onda, caracteristicamente como uma célula OFF, mas na intensidade mais alta sua resposta ao vermelho foi de menor amplitude e sem o transiente OFF. Estímulos anulares de intensidade média produziram respostas antagônicas ao observado no centro (respostas ON). Contudo, na periferia a estimulação nas intensidades média e alta podemos observar respostas sustentadas despolarizantes nos estímulos UV azul, e verde e uma resposta hiperpolarizante sustentada no estímulo vermelho.

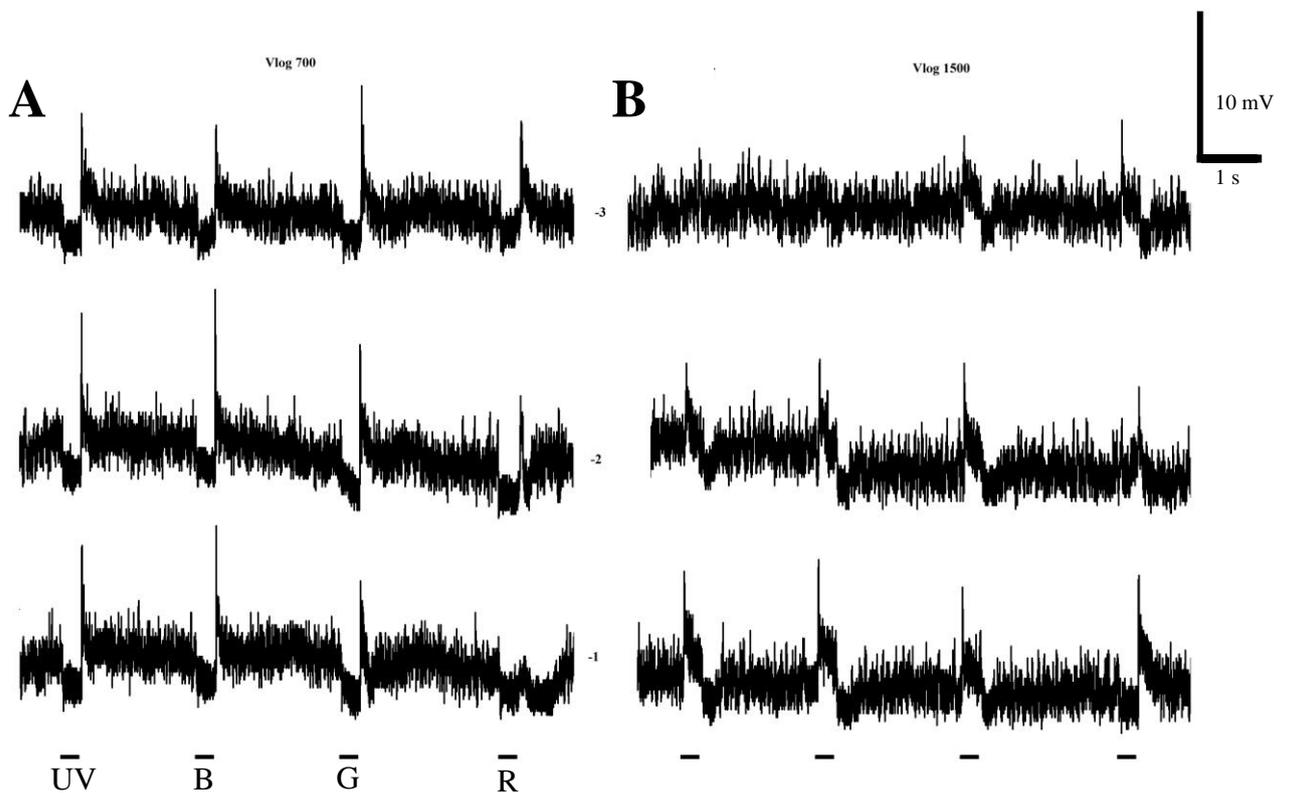


Figura 33. Registros intracelulares de uma célula ganglionar (T32RC3) com dupla oponência. (A) Registros obtidos da estimulação central do campo receptivo ($\emptyset = 700 \mu\text{m}$) nas intensidades três intensidades. (B) Registros obtidos a partir da estimulação da periferia do campo receptivo com estímulos anulares ($\emptyset = 1500/1050 \mu\text{m}$) nas três intensidades.

Esta célula foi injetada e analisada no microscópio confocal. O desenho da célula, com escala de cores e a visão lateral são mostrados na figura 34. Esta célula amácrina é uma célula de médio porte com 16 μm de diâmetro de corpo celular e 501 μm de diâmetro de árvore dendrítica. Na imagem confocal podemos notar células ganglionares acopladas (setas) a esta célula amácrina, e na representação lateral da célula podemos notar a estratificação da célula na sublâmina 4.

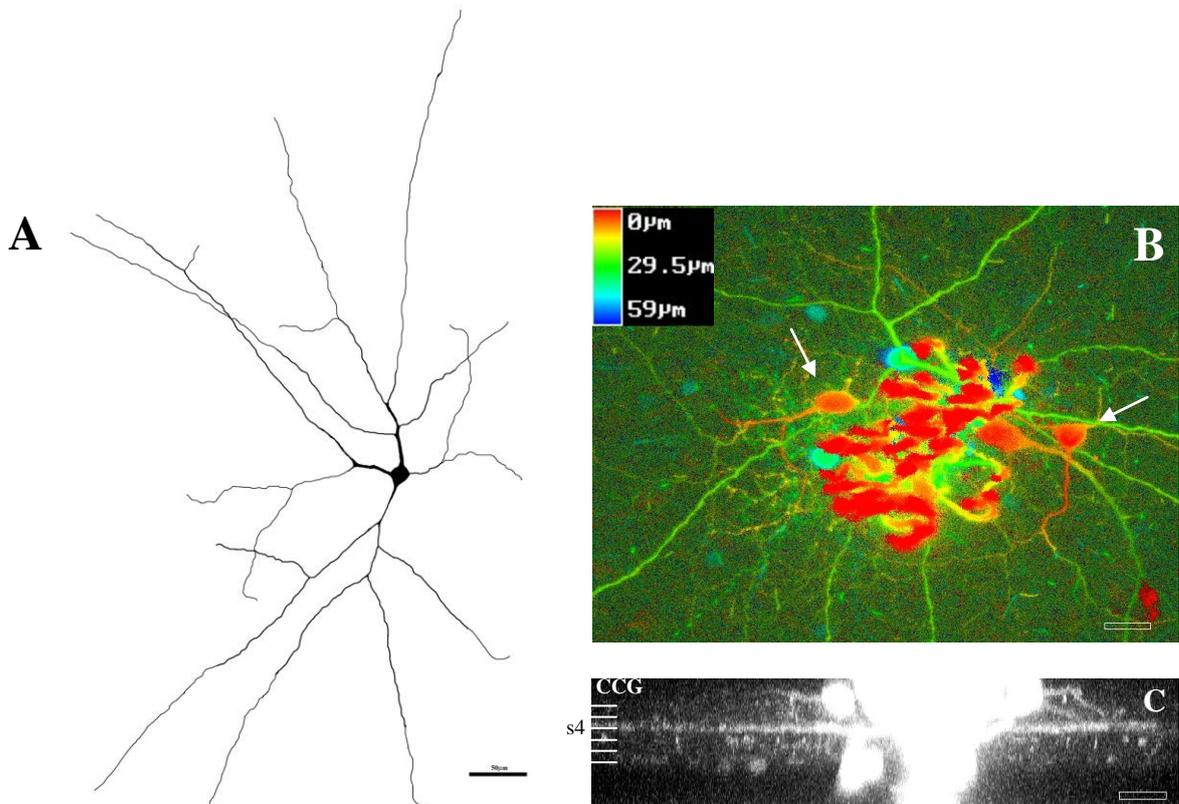


Figura 34. Desenho esquemático e reconstrução bidimensional de uma célula amácrina (T32RC3). (A) Célula amácrina identificada como A19 com estratificação na sub-lâmina s4 (escala = 50 μm). (B) Na imagem reconstruída podemos notar a célula amácrina acoplada à células ganglionares (escala 25 μm). (C) visão vertical da célula amácrina mostrando a estratificação da célula amácrina.

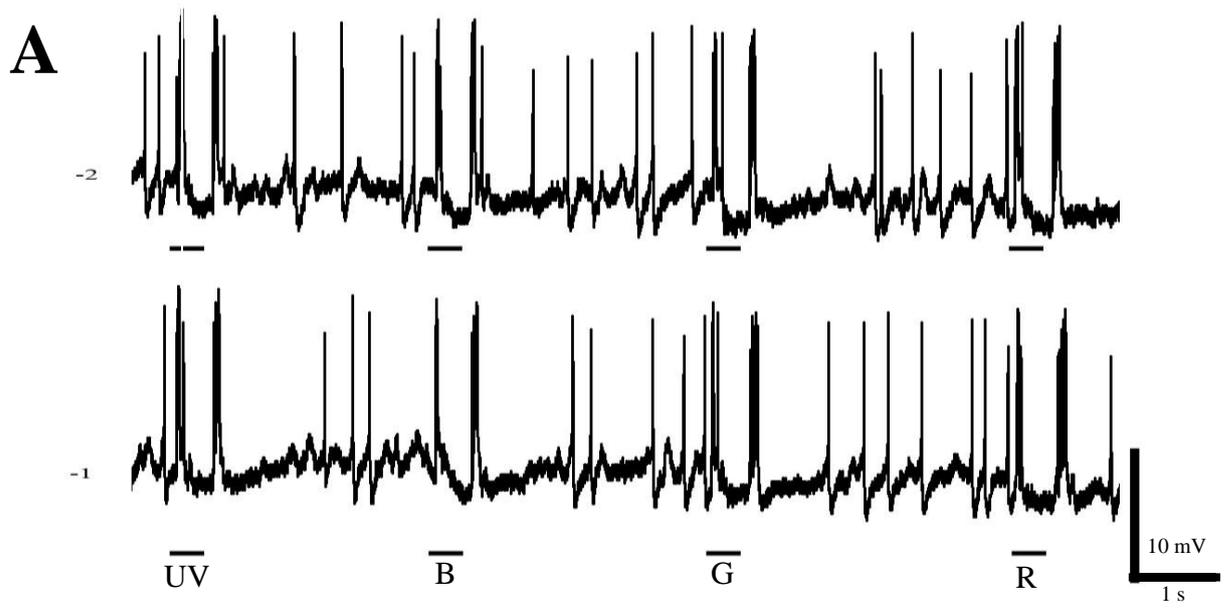
3.3. CÉLULAS GANGLIONARES SEM OPOÊNCIA CROMÁTICA

Cerca de 77% das células, entre células ganglionares e amácrinas, registradas neste estudo não apresentaram qualquer tipo de oponência cromática. Nesta secção apresentaremos apenas algumas destas células, focalizando principalmente nas células em que além do registro também conseguimos descrever a morfologia das células.

3.3.1. Células Ganglionares tipo ON

Aproximadamente 16,5% das células ganglionares registradas tiveram respostas ON (despolarizantes) quando estimuladas tanto no centro quanto na periferia do campo receptivo.

Na figura 35 mostramos o registro e a morfologia de uma célula ON. Os registros foram obtidos com estímulos circulares de 300 μm . Para estes estímulos notam-se respostas despolarizantes transientes na presença e na retirada de todos os estímulos (Figura 35A). A morfologia mostra uma célula de grande porte com um diâmetro de campo dendrítico de aproximadamente 600 μm e 31 μm de diâmetro de corpo celular. Podemos notar um alto padrão de ramificação desta célula com grande parte do campo dendrítico preenchido; a estratificação da célula ocorreu nos estratos s1 e s3/4 e a morfologia corresponde a uma célula do tipo G22.



B

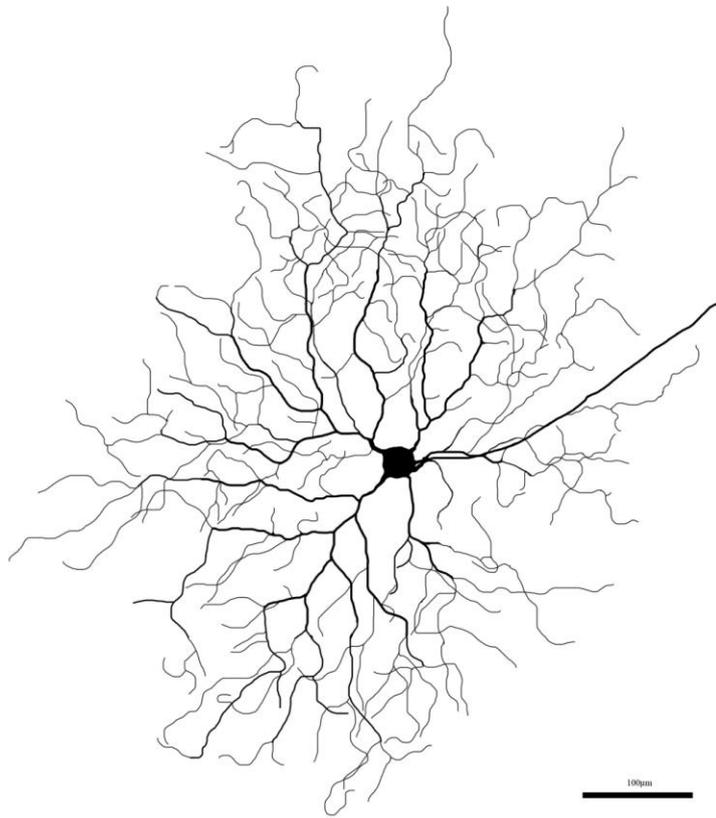


Figura 35

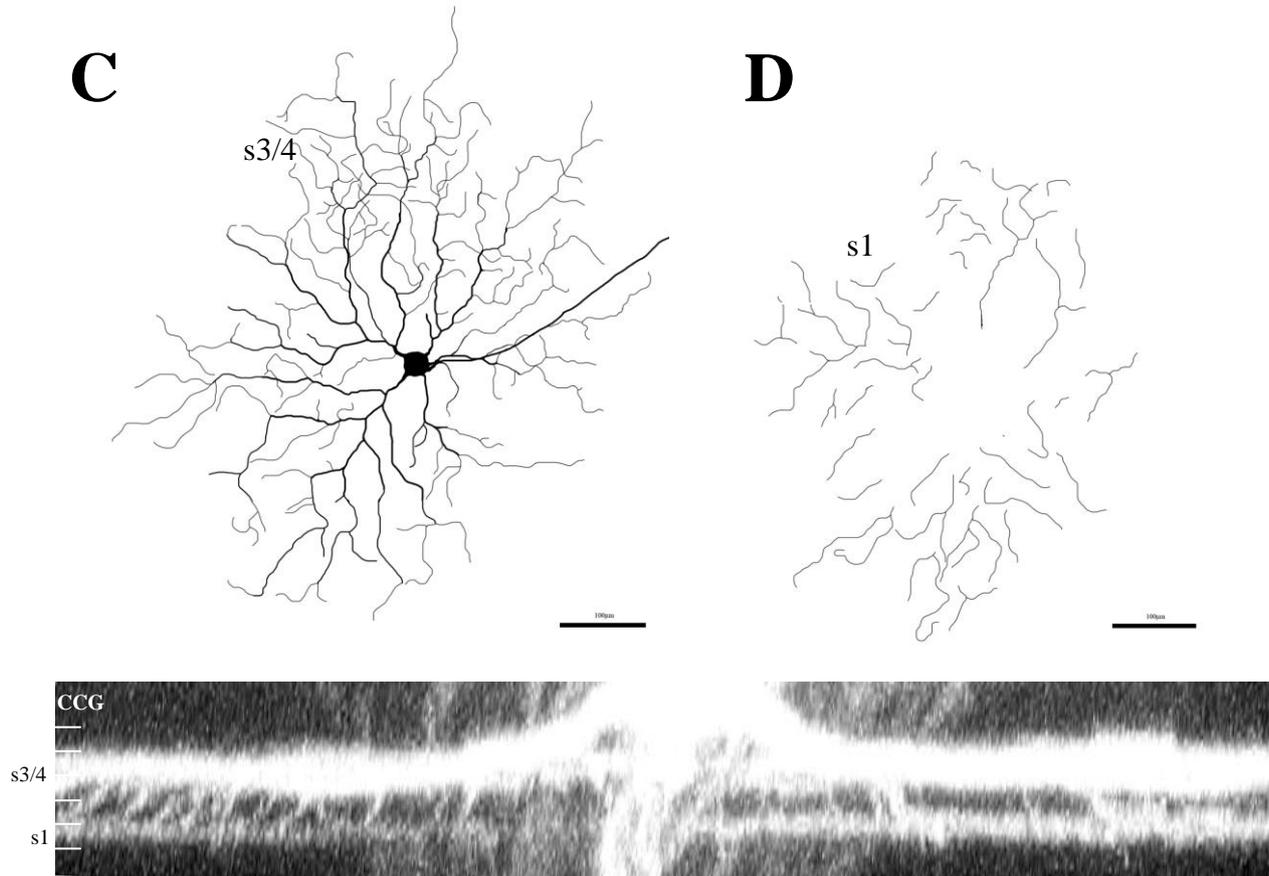


Figura 35. Registros intracelulares e a morfologia da célula ganglionar (T47RC2) do tipo ON. (A) Registros obtidos da estimulação central do campo receptivo ($\varnothing = 300 \mu\text{m}$) nas intensidades média e alta. (B) Desenho da célula ganglionar (escala = $100 \mu\text{m}$). (C) estratificação na sub-lâminas s2. (D) estratificação na sub-lâminas s4/5. (E) visão vertical da célula ganglionar.

Outra célula ganglionar ON registrada (T39RC2) com sucesso e injetada com neurobiotina é mostrada na figura 36. Esta célula ganglionar tem um tamanho médio com diâmetros de campo dendrítico e corpo celular de 346 μm e 15 μm . Caracteristicamente a célula tem uma arborização dendrítica simétrica com ramificações que preenchem em grande parte a área do campo dendrítico. A estratificação ocorre nas sublâminas s1 e s3. Na figura 30B o perfil das respostas é mostrado para estímulos centrais no campo receptivo da célula. Os testes com ânnulos resultaram em respostas inibitórias para todos os comprimentos de onda (dado não mostrado), caracterizando a célula com oponência espacial centro-ON e periferia-OFF.

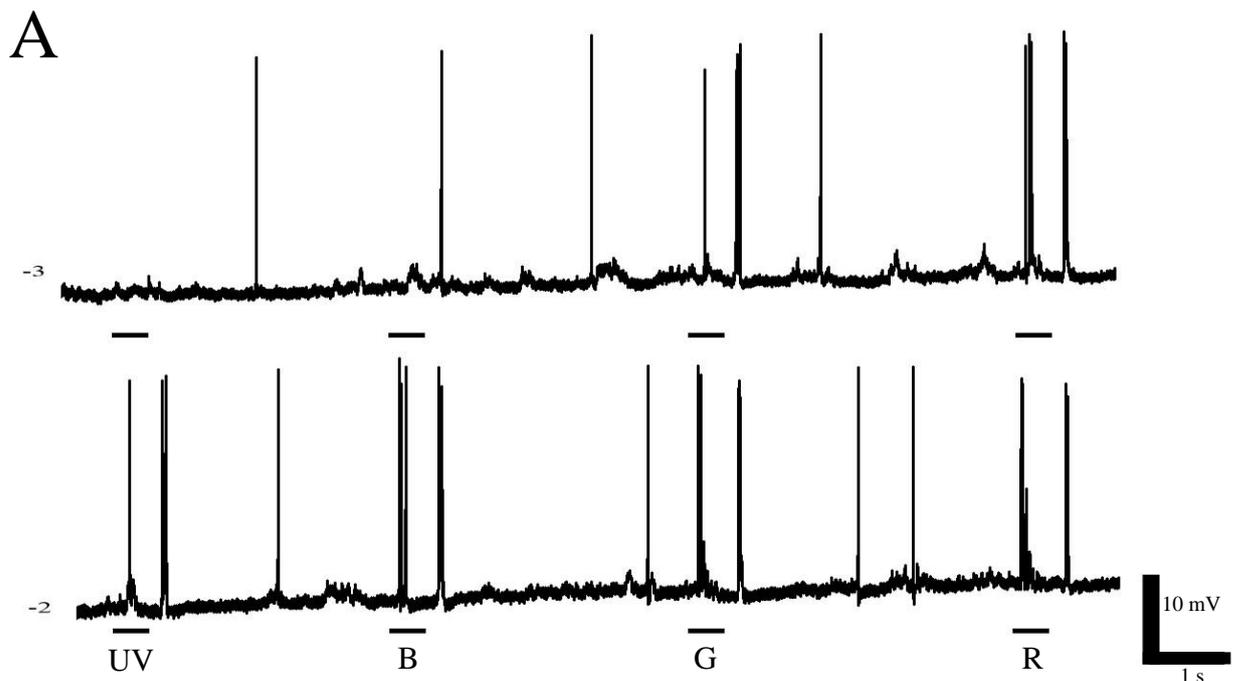


Figura 36

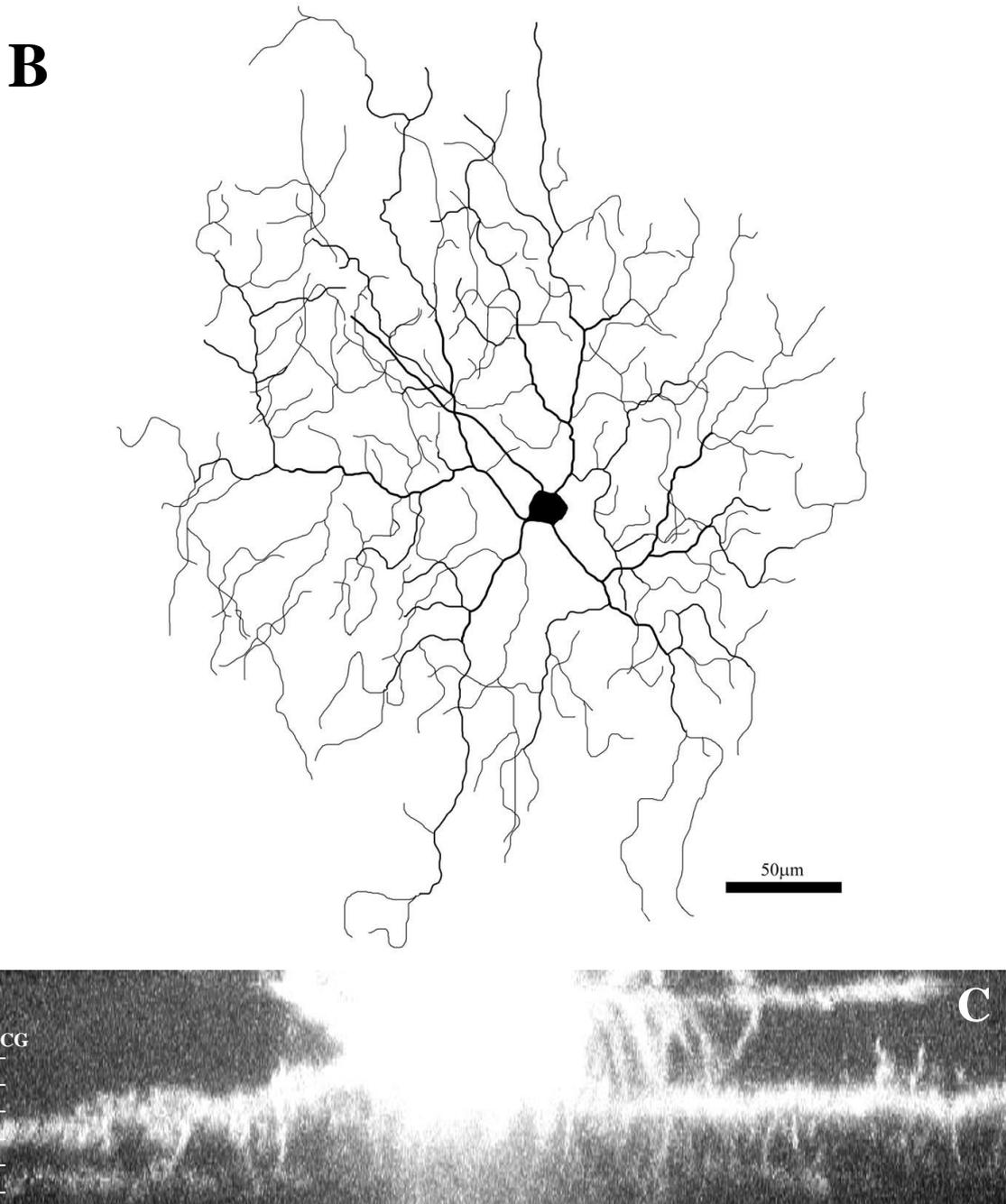


Figura 36. Desenho e registros intracelulares de uma célula ganglionar (T39RC2) aos estímulos 370 (UV), 450 (B), 540 (G) e 640 nm (R). (A) célula ganglionar não identificada com estratificação nas sub-lâminas s1 e s3. (B) registros obtidos da estimulação central do campo receptivo ($\varnothing = 700 \mu\text{m}$) nas baixa e média. (C) visão vertical da célula ganglionar.

A célula ganglionar (T43RC5) teve respostas despolarizantes transientes para o acender quando estimulada com círculos (600 mm); notamos também uma forte componente hiperpolarizante no apagar da luz. Na figura 31A mostramos uma série espectral com estímulos que vão da luz UV à luz vermelha em passos de 40 nm. Esta célula foi injetada e analisada com microscopia confocal (Figura 37B). Na reconstrução bidimensional da célula notamos uma célula amácrina acoplada à célula ganglionar. Analisando no plano vertical podemos observar uma densa estratificação na borda da sublámina s2 e a conexão com a célula amácrina.

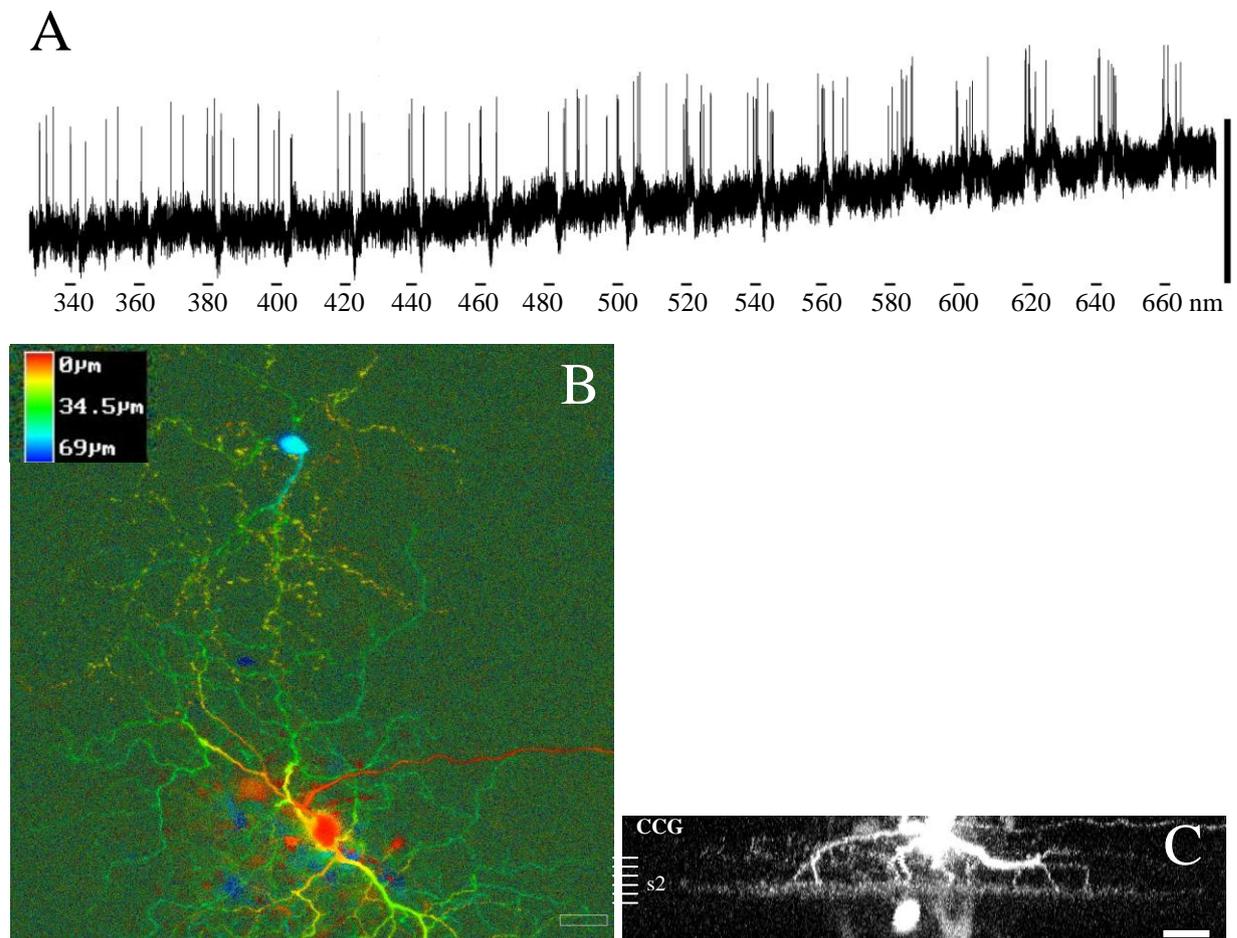


Figura 37. Registros intracelulares de uma célula ganglionar (T43RC5). (A) Série espectral realizada com círculos de 1500 de diâmetro em passos de 40 nm entre os estímulos na intensidade de $-1 \log$. (B) Imagem reconstruída da célula ganglionar; (C) visão vertical da célula ganglionar (escala 25 μm).

Foi registrada e marcada uma célula ganglionar (T43RC5) deslocada (Figura 38). A fisiologia de células ganglionares deslocadas ainda não havia sido descrita na retina da tartaruga até o presente trabalho. As respostas desta célula aos estímulos UV, azul, verde e vermelho em três intensidades distintas são mostradas na figura 38A, onde podemos notar respostas despolarizantes sustentadas nas intensidades média e alta. Os testes na periferia do campo receptivo não mostraram antagonismo entre o centro e a periferia do campo receptivo da célula (não ilustrado).

O desenho da célula (Figura 38B) mostra uma célula com uma árvore dendrítica relativamente simétrica com bifurcações regulares dos dendritos na formação da arborização da célula. As dimensões da árvore dendrítica e corpo celular foram de 586 e 22,5 de diâmetro. Na reconstrução da célula notamos uma grande diferença entre a localização do corpo celular e do axônio quanto à profundidade representada por cores (Figura 38C). Na observação lateral da célula, notamos a localização do corpo celular da célula ganglionar posicionado na camada nuclear interna, caracterizando-a como uma célula deslocada.

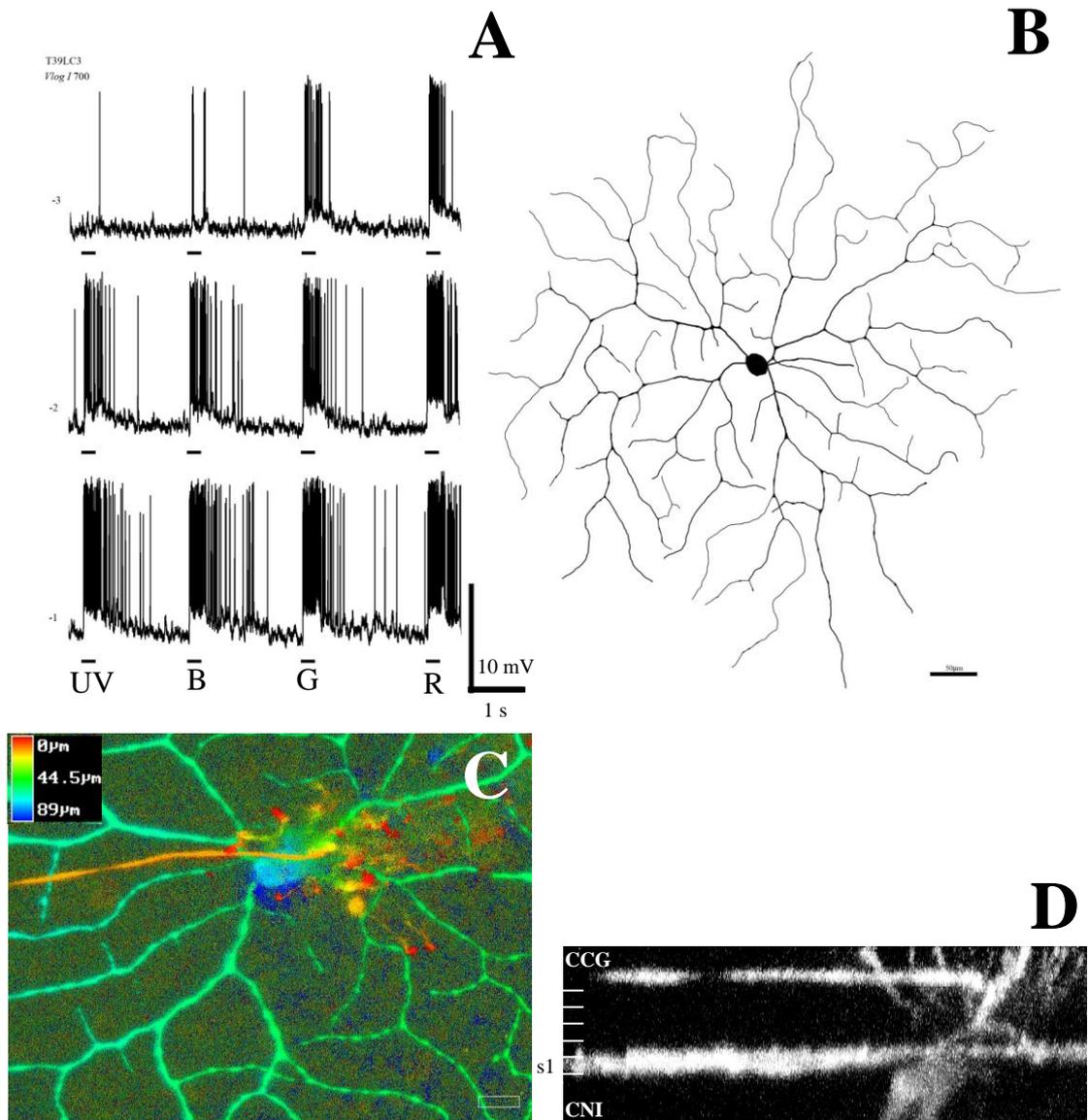


Figura 38. Registros intracelulares e morfologia de uma célula ganglionar tipo ON (T43RC5). (A) registros obtidos a partir da estimulação central do campo receptivo ($\varnothing = 700 \mu\text{m}$) nas três intensidades; (B) Desenho esquemático da célula ganglionar; (C) Imagem reconstruída da célula ganglionar; (D) visão vertical da célula ganglionar deslocada.

3.3.2. Célula Ganglionar OFF

Células ganglionares com respostas OFF corresponderam a cerca de 12,2 % de todas as células registradas neste estudo. Um exemplo de uma célula ganglionar OFF que foi registrada e injetada com neurobiotina, está mostrado na figura 39. É uma célula de pequeno porte com diâmetros de corpo celular e campo dendrítico de 14,5 e 171 μm respectivamente. A estratificação ocorre de maneira difusa ao longo da CPI, mas principalmente nas sublâminas s4 e s5, e menos freqüentes nas sublâminas s1 e s2 (Figura 39C). Na figura 39B mostramos os registros para diferentes comprimentos de onda em três intensidades.

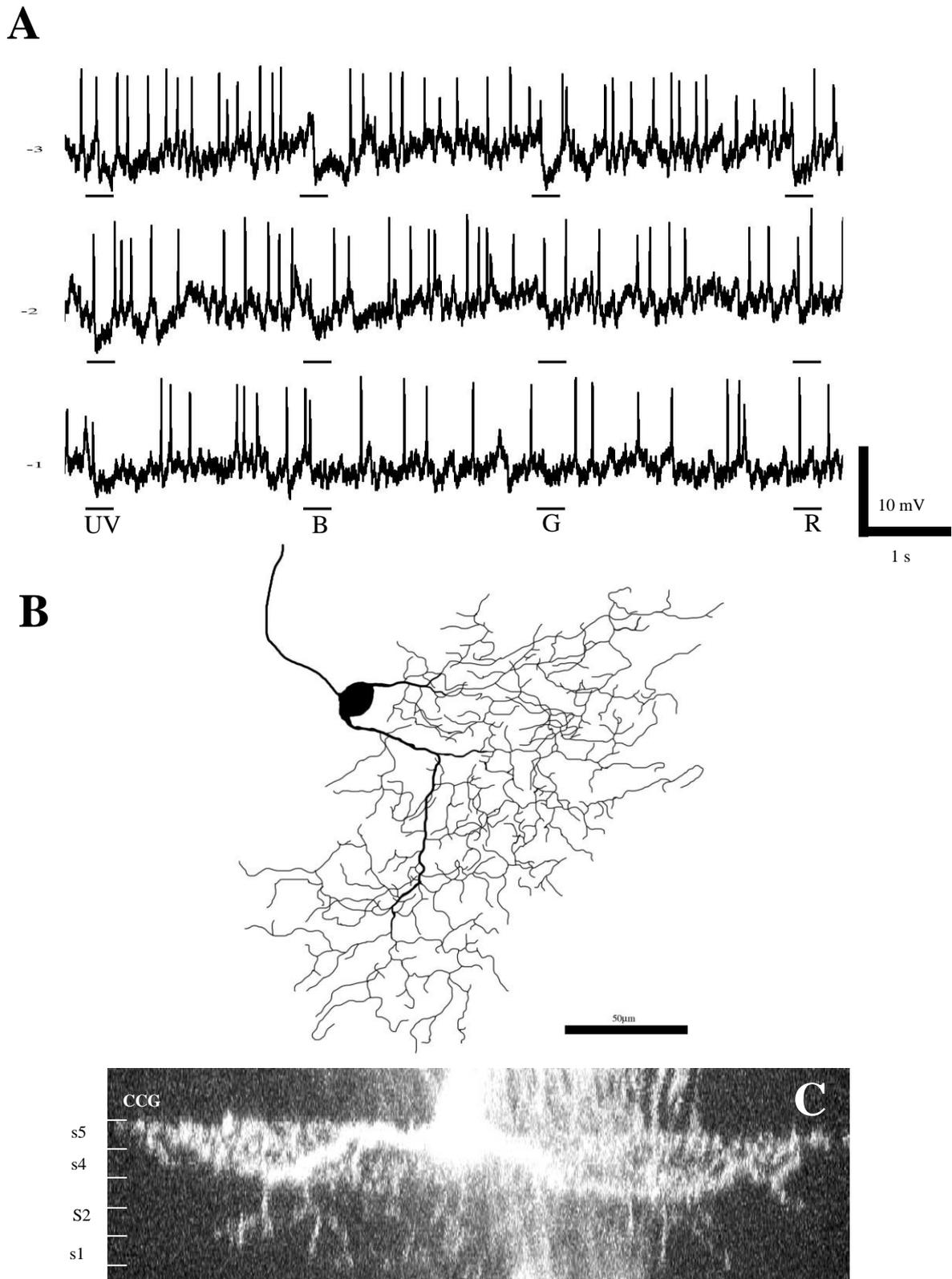


Figura 39. Registros intracelulares e morfologia de uma célula ganglionar tipo OFF (T42RC3). (A) registros obtidos a partir da estimulação central do campo receptivo ($\varnothing = 300 \mu\text{m}$) nas três intensidades; (B) Desenho esquemático da célula ganglionar; (C) visão vertical da célula ganglionar.

Outro exemplo de uma célula ganglionar OFF está ilustrado na figura 34. Primeiramente mostramos a reconstrução bidimensional (Figura 40A), onde podemos notar um grande distanciamento da posição do corpo celular (laranja) e a arborização dendrítica (anil). Em seguida mostramos o desenho da célula (40B), e a visão lateral da célula (40C) onde podemos notar a célula estratificando em s1. As dimensões da arborização dendrítica e corpo celular foram de 485 e 35 μm .

O registro intracelular (Figura 40D) mostra que sob estímulos com intensidade intermediária a célula tem uma resposta OFF sustentada apenas quando é estimulada com luz vermelha. Sob estimulação com luz azul e verde a célula responde com hiperpolarizações transientes, e o estímulo UV não altera o disparo da célula nessa intensidade. Na intensidade mais alta a resposta OFF para todos os comprimentos de onda testados é mais evidente.

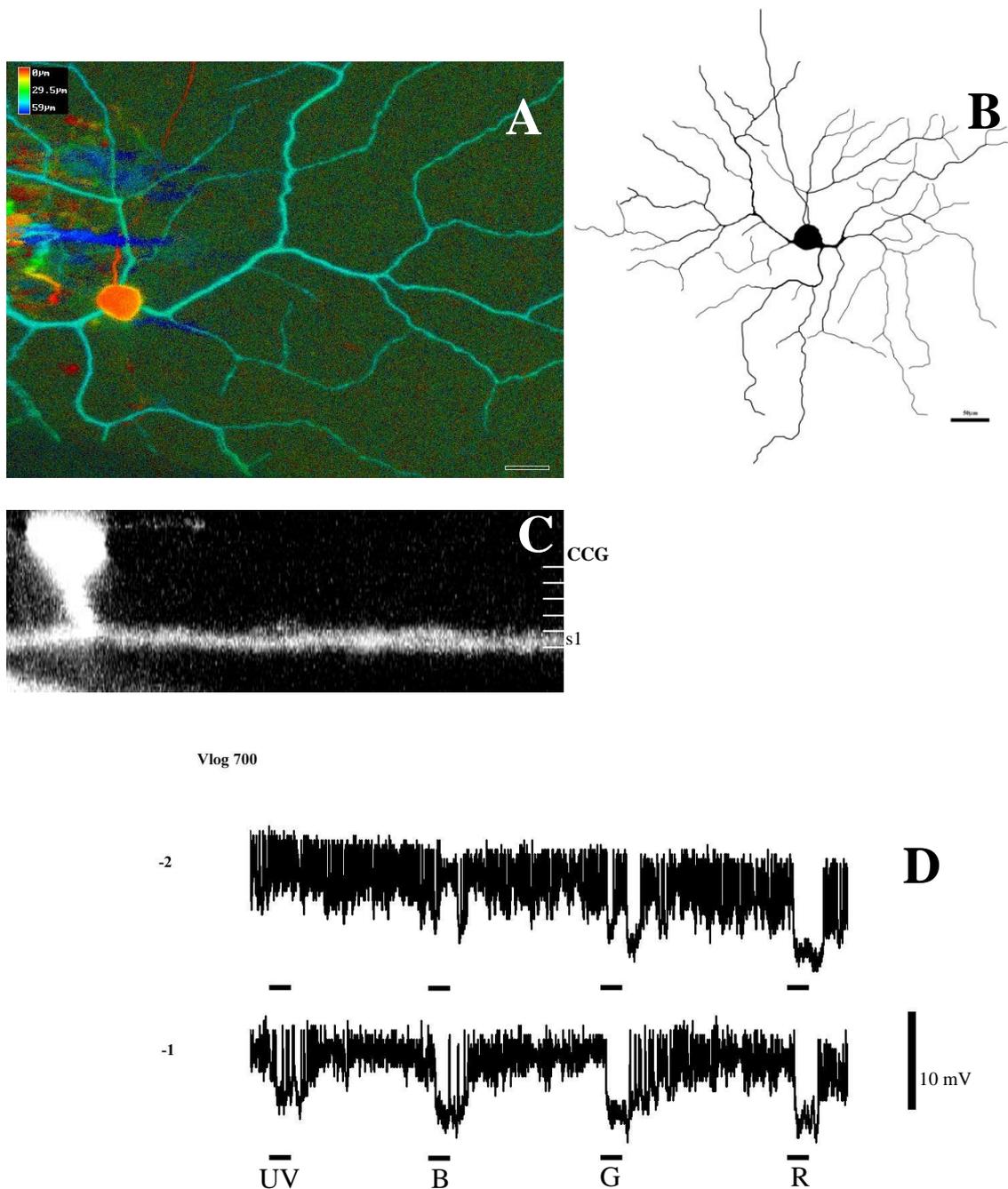
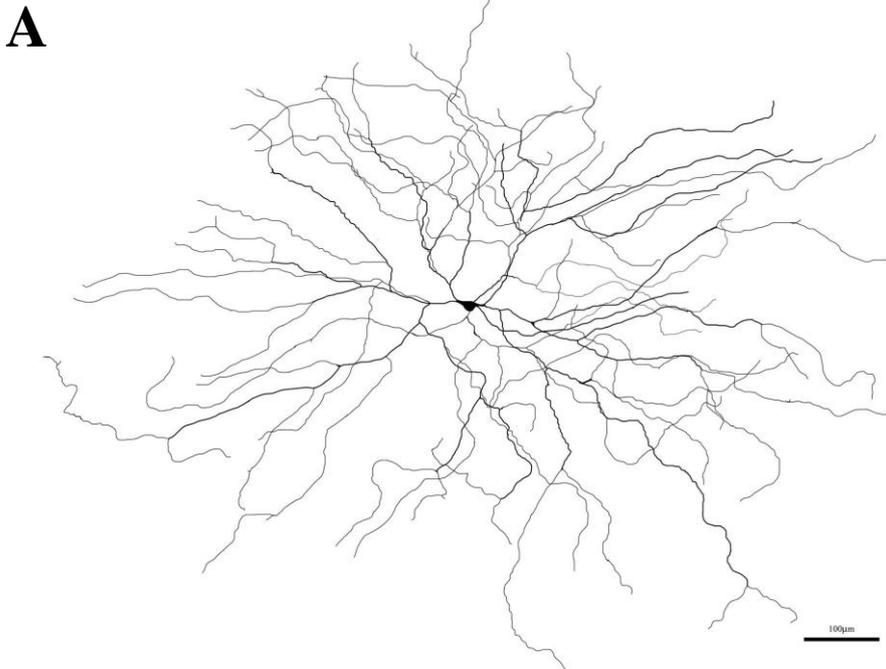


Figura 40. Morfologia e registros intracelulares de uma célula ganglionar tipo OFF (T31RC3). (A) Reconstrução bidimensional da célula ganglionar na qual a informação de profundidade é representada na forma de um código de cor (escala de cor é mostrada no canto esquerdo) (B) Desenho esquemático da célula ganglionar (escala = 50 μm) (C) visão vertical da célula ganglionar deslocada. (D) registros obtidos a partir da estimulação central do campo receptivo ($\varnothing = 700 \mu\text{m}$) nas intensidades média e alta.

3.3.3. Células Ganglionares OFF-ON

Os tipos menos frequentes de células ganglionares registradas, neste trabalho, foram os que tiveram respostas antagônicas entre o centro e a periferia do campo receptivo (centro - ON / periferia – OFF ou centro - OFF / periferia – ON). Aproximadamente 2,2 % das células ganglionares responderam aos estímulos no centro do campo receptivo com hiperpolarizações e na periferia com respostas despolarizantes para todos os comprimentos de onda de teste.

Uma destas células (T35RC3) foi injetada e sua morfologia pode ser analisada. Na figura 41A mostramos o desenho da célula a qual tem uma ampla arborização dendrítica com cerca de 930 μm de diâmetro. Na reconstrução da célula (Figura 41B) notam-se dois níveis de estratificação, identificados nas sublâminas s2 e s4/5 na visão vertical da célula (41C). Por fim, mostramos o registro da célula ganglionar com estímulos circulares e anulares na intensidade máxima de estimulação (41D, E).



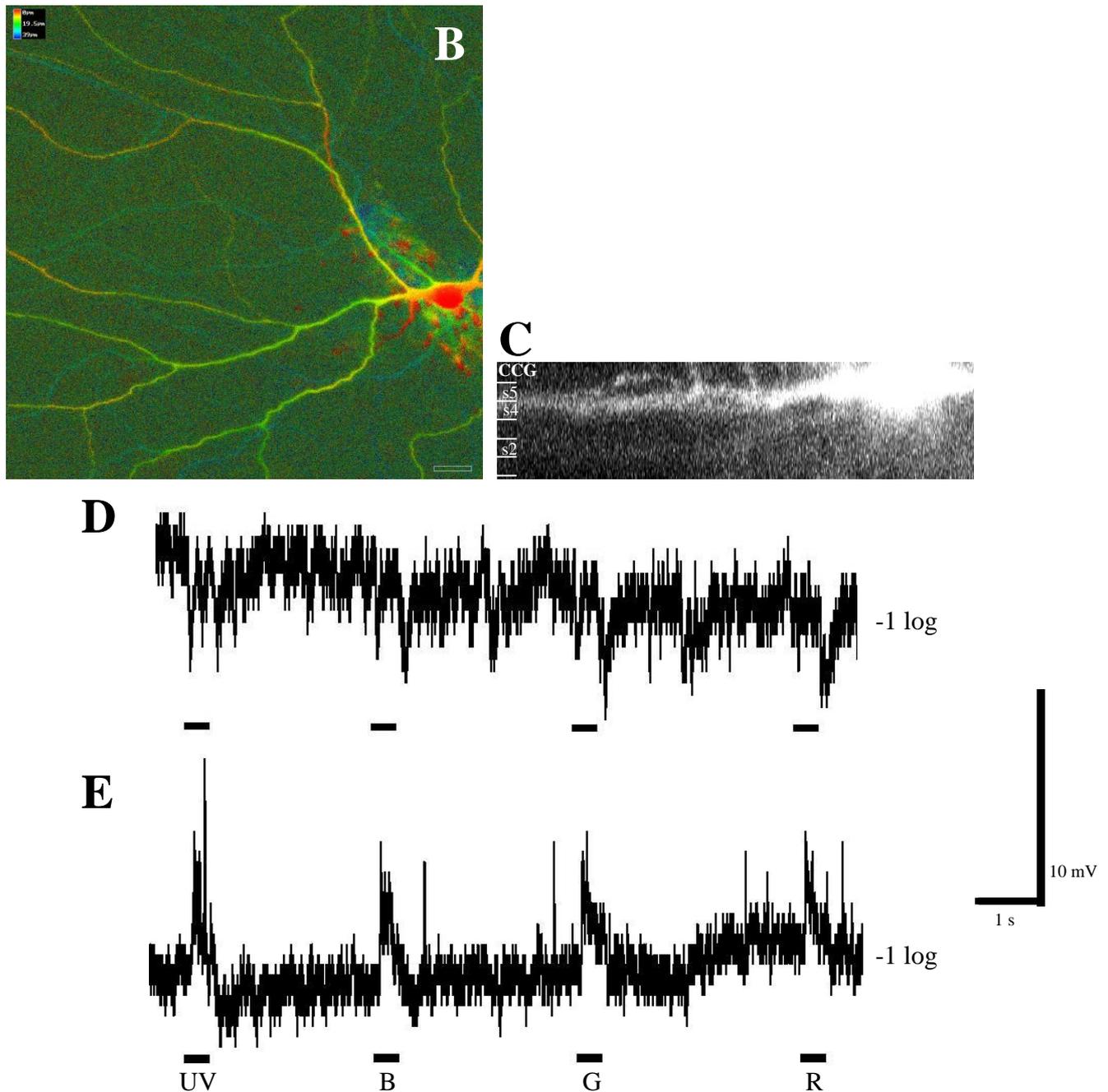
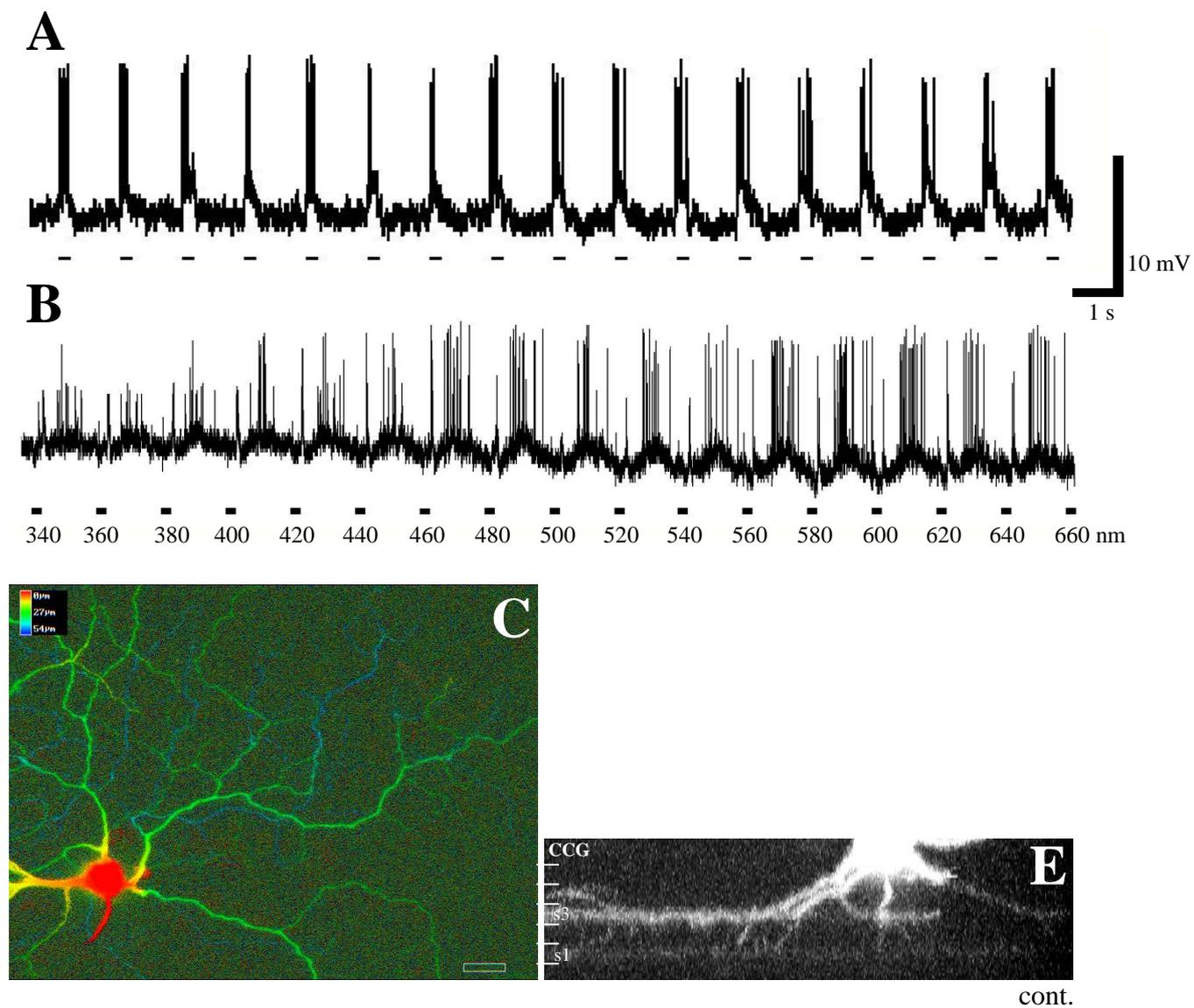


Figura 41. Morfologia e registros intracelulares de uma célula ganglionar tipo OFF/ON (T35RC3). (A) Desenho esquemático da célula ganglionar (escala = 100 μm); (B) Reconstrução bidimensional da célula ganglionar na qual a informação de profundidade é representada na forma de um código de cor (escala de cor é mostrada no canto esquerdo); (C) visão vertical da célula ganglionar. (D) Registros da célula ganglionar obtidos com estimulação na periferia do campo receptivo (1500/1000 μm).

3.3.4. Células ganglionares ON-OFF

Cerca de 6,1 % das células ganglionares tiveram respostas despolarizantes no centro do campo receptivo e respostas hiperpolarizantes na periferia configurando oponência espacial. A morfologia e o registro de uma destas células são mostrados na figura 42. Esta é uma célula de médio porte com diâmetros de corpo celular e árvore dendrítica de 29,5 e 483,5 μm .



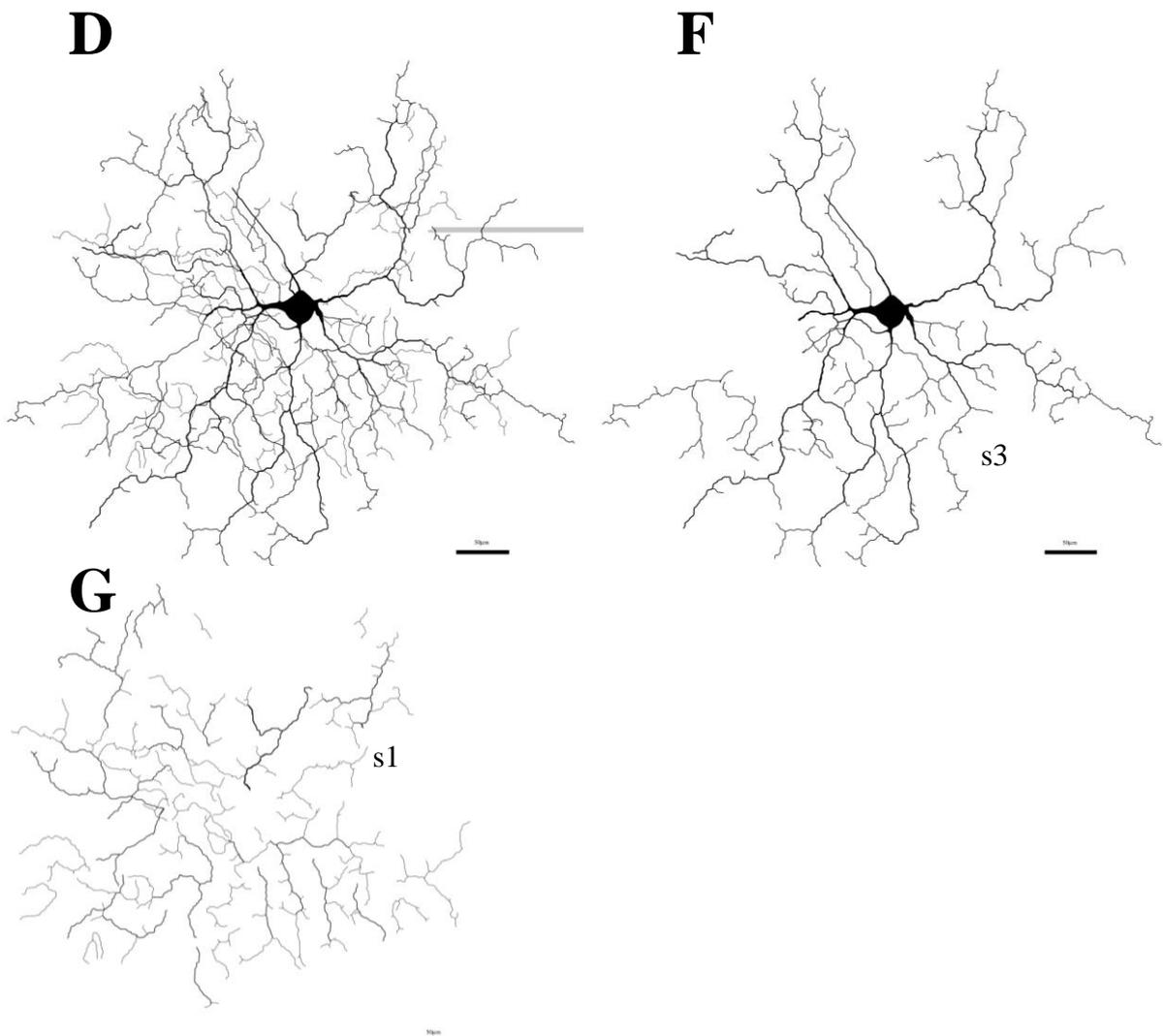


Figura 42. Registro e morfologia de uma célula ganglionar tipo ON/OFF (T35RC4). (A) Registro da célula obtido a partir da estimulação central do campo receptivo (700 μm). (B) Registro da célula obtido a partir da estimulação periférica do campo receptivo (1500/1000 μm). Reconstrução bidimensional da célula ganglionar na qual a informação de profundidade é representada na forma de um código de cor; (C) Visão vertical da célula ganglionar estratificando nas sublâminas s1 e s3. (CCG) camada de células ganglionares. (D) Desenho esquemático da célula ganglionar. (E) Desenho da célula ganglionar mostrando a estratificação apenas na sublamina s3. (F) Desenho da célula ganglionar mostrando a estratificação apenas na sublamina s5. (escala = 50 μm)

4. DISCUSSÃO

A discriminação cromática requer uma comparação de sinais provenientes dos fotorreceptores de diferentes sensibilidades espectrais, tipicamente através da oponência cromática. Um sistema visual com n tipos de cones tem n amostras do espectro de luz, neste caso estímulos podem ser representados como um ponto em um espaço n -dimensional. Para o sistema usar essa informação completamente, e assim ter visão “ n -cromática”, subseqüentemente a codificação neural deve ter n graus de liberdade (OSORIO *et al.*, 1999).

Neste trabalho investigamos principalmente os tipos de oponências cromáticas existentes na retina de um animal potencialmente tetracromata, em outras palavras o grau de liberdade que um sistema tetracromata pode ter, dado a presença de quatro diferentes receptores, utilizando para tanto ferramentas metodológicas que combinavam eletrofisiologia e morfologia semelhantes às utilizadas em estudos anteriores. Nosso protocolo de estimulação se assemelha ao utilizado por Ammermüller e colaboradores (1995) o que possibilitou a comparação de nossos resultados com os já descritos. Esses autores publicaram um denso trabalho que classificou morfofisiologicamente células ganglionares e amácrinas na retina da tartaruga, e descreveram os tipos de oponência cromática neste animal utilizando três estímulos (azul ($\lambda = 455$ nm), verde ($\lambda = 525$ nm e vermelho ($\lambda = 621$ nm)).

Apesar da retina da tartaruga ser cone-dominante e ter quatro cones com diferentes sensibilidades espectrais, dos 181 neurônios neste estudo apenas cerca de 15 % eram células ganglionares com algum tipo de oponência cromática. Entretanto, este número é muito semelhante ao encontrado na literatura por outros autores que investigaram células oponentes na retina da tartaruga (AMMERMÜLLER *et al.*, 1995). A grande maioria das células registradas neste estudo não foram oponentes, sendo classificadas simplesmente como células ON, OFF, ON-OFF ou OFF-ON, essas células perfazem cerca de 80 % das células encontradas neste trabalho. Nosso protocolo de estimulação, contudo não permitiu uma

classificação funcional mais específica das células classificadas como não oponentes visto que o presente estudo focalizou o aspecto cromático. Espécies com faixa visual, como a tartaruga (KOLB, 1982) têm grande proporção de células ganglionares seletivas à direção e orientação do estímulo (AMTHOR *et al.*, 1989; GRANDA & FULBROOK, 1989; AMMERMÜLLER *et al.*, 1995).

A injeção intracelular foi satisfatória em algumas células registradas, as quais foram ilustradas na seção de Resultados. A classificação morfológica das células foi dificultada, em parte, pela ausência de dois ou mais exemplares de um mesmo tipo registrado. Apesar disso, conseguimos identificar alguns tipos com base em características morfológicas como tamanho do corpo celular, tamanho e forma do campo dendrítico, e níveis de estratificação na camada plexiforme interna. Essas características foram comparadas com neurônios descritos em trabalhos anteriores (AMMERMÜLLER & KOLB, 1995; AMMERMÜLLER *et al.*, 1995). Dessa maneira conseguimos identificar os seguintes tipos: G21; G24; G17; A23b; A19; G2; G18; G22. Outros tipos de células ganglionares marcados não puderam ser classificados segundo a literatura. Contudo um estudo morfométrico mais refinado faz-se necessário para o estabelecimento de novos tipos celulares ao conjunto de células já descrita na literatura. Na tabela 3, mostramos todas as células marcadas neste estudo.

Um achado muito interessante foi uma célula ganglionar (T43RC5, Figura 38) cujo corpo celular estava posicionado na camada nuclear interna da retina o que caracteriza uma célula ganglionar deslocada. Células deslocadas são elementos neuronais que já foram descritos em outras espécies de vertebrados (SILVEIRA *et al.*, 1989; DE LIMA *et al.*, 2005), contudo a função destas células ainda continua incerta. Na retina da tartaruga ainda não havia sido descrita nenhuma célula deslocada até o presente momento, o que mostra a dificuldade de registro de células ganglionares deslocadas.

Tabela 4. Células registradas e marcadas na retina interna

Célula	Tipo Morfológico	Tipo Fisiológico
T21RC2 – Fig. 18	Ganglionar (não identificada)	GR+ UVB-
T35RC4 – Fig. 42	Ganglionar (não identificada)	ON/OFF
T35RC3 – Fig. 41	Ganglionar (não identificada)	OFF/ON
T31RC3 – Fig. 40	Ganglionar G18	OFF
T42RC3 – Fig. 39	Ganglionar G14	OFF
T43RC5 – Fig. 38	Ganglionar deslocada (não identificada)	ON
T27RC8 – Fig. 20	Ganglionar G17	GR+UVB-
T43RC5 – Fig. 37	Ganglionar (não identificada)	ON-OFF
T39RC2 – Fig. 36	Ganglionar G22	ON-OFF
T47RC2 – Fig. 35	Ganglionar (não identificada)	ON
T47RC4 – Fig. 11	Ganglionar G21	R+ UVBG-
T42LC2 – Fig. 16	Ganglionar G24	BGR+ UV-
T27RC2 – Fig. 32	Amácrina A23b	UVBG+ R-
T32RC3 – Fig. 34	Amácrina A22	UVBG+ R-

4.1. CÉLULAS AMÁCRINAS Oponentes

Neste estudo, encontramos quatro tipos de oponência cromática em células amácrinas, registradas, as quais constituem apenas 5% da população total de células aqui registradas. O tipo de oponência R+UVBG- foi o mais encontrado, os outros tipos de oponência (GR+UVB-; BGR+UV-, e UV+BGR-) foram menos frequentes. Duas células

amácrinas com oponência UVBG+R- foram marcadas e identificadas como sendo do tipo A23b e A19 (Figuras 32B e 34, respectivamente). A célula A23b foi primeiramente identificada como uma célula com oponência espectral do tipo BG+R- (AMMERMÜLLER *et al.*, 1995). No presente estudo a inclusão da estimulação da luz UV não alterou a propriedade espectral da célula, havendo apenas a inclusão da entrada UV na oponência espectral (Figura 32B), o que resulta em uma pequena mudança na classificação espectral desta célula (UVBG+R-).

O outro tipo de célula amácrina identificada morfolologicamente foi caracterizada como A19. Esta célula foi descrita originalmente (AMMERMÜLLER *et al.*, 1995) como sendo do tipo OFF-ON, ou seja, com respostas OFF no centro do campo receptivo e ON na periferia. A célula amácrina registrada neste trabalho também respondeu com atividade hiperpolarizante (OFF) no centro do campo receptivo em todos os comprimentos de onda (Figura 33A). Na periferia, respostas ON foram observadas nas intensidades baixa e média, contudo a oponência cromática desta célula foi observada na estimulação com intensidade máxima (-1 log) quando a célula respondeu com oponência do tipo UVBG+R- (Figura 33B). Este resultado mostra claramente a importância da inclusão da estimulação na faixa do UV nos experimentos de visão de cor na tartaruga, uma vez que estes resultados sugerem a necessidade de mudanças no quadro geral de classificação das células retinianas da tartaruga.

Ammermüller e colaboradores (1995) foram os primeiros autores a registrar oponência cromática em células amácrinas na retina da tartaruga. Os autores descreveram quatro tipos diferentes oponências cromáticas, sendo estas distribuídas em seis células amácrinas identificadas morfolologicamente. Contudo, é importante salientar que estes achados não incluíam a estimulação na faixa do ultravioleta. Posteriormente, Ventura e colaboradores (2001) incluíram luz UV no protocolo de estimulação e encontram dois tipos de oponência cromática em células amácrinas, sendo uma delas identificada como sendo do tipo A22. Na

tabela 5 compilamos os resultados de ambos os trabalhos citados anteriormente e acrescentamos os resultados deste trabalho.

Em nosso estudo encontramos as duas oponências encontradas por Ventura e colaboradores (1999), acrescentando mais dois tipos diferentes de oponência. Por outro lado, se não levarmos em consideração a estimulação na faixa do ultravioleta três oponências foram semelhantes às descritas por Ammermüller e colaboradores (1995). Esses resultados indicam que os tipos de células amácrinas oponentes são mais numerosas e do que se pensava anteriormente.

Tabela 5. Compilação das oponências espectrais e tipos morfológicos de amácrinas ganglionares.

Estudos	Resposta espectral				Tipo celular
	UV	B	G	R	
Ammermüller <i>et al.</i> , 1995	?	-	+	+	A14
	?	-	-	+	A33
	?	+	-	-	A3
	?	+	+	-	A1; A23b; A32
Ventura <i>et al.</i> , 2001	-	-	-	+	*
	+	+	+	-	A22
Presente estudo	-	-	-	+	A23b; A19
	-	-	+	+	
	-	+	+	+	
	+	+	+	-	

Legenda:

+ = Despolarização

- = Hiperpolarização

? = Estímulo não testado

* = Célula não identificada

4.2. OPONÊNCIA CROMÁTICA E INTENSIDADE DO ESTÍMULO

De uma maneira geral as respostas das células ganglionares tiveram componentes de respostas dependentes dos comprimentos de onda e da intensidade do estímulo, isto é, componentes que estiveram presentes em determinados parâmetros do estímulo e ausentes quando os parâmetros foram alterados. As respostas de várias células registradas na retina interna mostraram um perfil complexo e um potencial para processamento dinâmico do estímulo cromático. A consequência para a análise dos resultados foi dificultar a tarefa de classificação do tipo de configuração cromática de determinadas células ganglionares.

Um exemplo do que estamos nos referindo pode ser observado no registro da célula ganglionar T27RC5 (Figura 15), sob estimulação com círculos de 700 μm de baixa intensidade (-3 log) a célula comporta-se como BR+UVG-, com o aumento da intensidade em um log a célula altera a codificação cromática para o tipo UV+BGR.

Um outro exemplo é mostrado na figura 16, onde uma célula registrada em um primeiro momento como UV+BGR- em baixa intensidade, passa a BGR+UV- nas intensidades média e alta. Ou seja, a resposta ao UV passa de excitatória a inibitória à medida que aumenta a intensidade, enquanto a resposta aos demais comprimentos de onda também é invertida, na direção oposta.

Não é fácil explicar quais as vantagens que esse tipo de fenômeno poderia trazer para o sistema visual assim como os mecanismos envolvidos na geração deste tipo de sinal. Contudo é conhecido que os campos receptivos de células ganglionares na retina da tartaruga consistem de área de excitação e inibição que coexistem e que são balanceadas e interativas em um sistema dinâmico (SENAGOR & GRZYWACZ, 1995; GRANDA & FULBROOK, 1989; GRANDA *et al.*, 1999; DEARWORTH & GRANDA, 2002). Uma consequência dessa interação é a mudança no arranjo do campo receptivo que pode ser alterado por propriedades

do estímulo, presumidamente por inibição lateral de unidades dentro da circuitaria retiniana (GRANDA *et al.*, 1999). O arranjo de campos receptivos de células ganglionares pode variar de formas simples que podem ser descritas por função Gaussiana para formas mais complexas, as quais apenas são descritas com múltiplas funções (ex. Gabor e Cardióide) (DEARWORTH & GRANDA, 2002). A propriedade de “plasticidade” dos campos receptivos poderia explicar em parte a não linearidade de resposta espectral de algumas células registradas no presente estudo.

Um outro tipo de mudança observada na resposta espectral está ilustrada na figura 19, na qual uma célula com oponência espectral do tipo R+UVBG-, sob estimulação de baixa intensidade, passa a responder com oponência do tipo GR+UVB- na intensidade máxima de estimulação. O ponto de reversão de verde para vermelho parece ser em diversas células uma função da intensidade. Outro exemplo ocorre no registro da célula ilustrada na figura 10, onde uma célula R+UVBG- perde a resposta cromática quando estimulada na intensidade máxima. Este fenômeno pode ser explicado simplesmente pelo fato de que em altas intensidades cones R são ativados por estímulos de comprimentos de onda mais baixos, influenciando assim as respostas de outros canais.

A expansão da codificação de cor para uma banda maior de possibilidades é alcançada, em parte, pela forma altamente dinâmica do processamento de cor. Uma célula ganglionar pode operar como uma célula oponente do tipo R+ G- a estímulos em um certo nível de intensidade e como R- G+ em outro nível, ou até se tornar não oponente em ainda outro nível de intensidade.

No peixe *Carassius auratus* (peixe-dourado ou “*goldfish*”) este tipo de comportamento dependente de intensidade foi observado em células bipolares mistas (células que recebem entradas tanto de cones quanto de bastonetes) com oponência e sem oponência cromática (JOSELEVITCH & KAMERMANS, 2007). Os autores argumentam que a

mudança na sintonia espectral das células conflita com a idéia de que canais de não-oponência e oponência funcionam separadamente para codificar brilho e cor, respectivamente e sugerem que a organização das células bipolares mistas em várias classes de diferentes faixas dinâmicas e sensibilidades absolutas pode ser uma estratégia para transmitir informação sobre todos os aspectos visuais mais eficientemente.

Os nossos resultados corroboram os dados anteriores (VENTURA *et al.*, 1999; VENTURA *et al.*, 2001) e mostram que as células codificadoras de cor na retina da tartaruga devem ser classificadas somente após consideração do efeito da intensidade do estímulo sobre suas características.

4.3. CÉLULAS GANGLIONARES OPONENTES

Onze tipos diferentes de oponências cromáticas foram encontradas, estendendo assim os achados anteriores que investigaram oponência cromática envolvendo a entrada UV (VENTURA *et al.*, 1999; 2001). Na tabela 5 compilamos nossos achados com os já existentes na literatura. Baseados nesses achados confirmamos sete oponências cromáticas descritas anteriormente por Ventura e colaboradores (2001) e adicionamos mais quatro novas oponências ao corpo do conhecimento.

Os tipos de oponências cromáticas mais encontradas foram R+UVBG- e GR+UVB-. Em alguns casos oponências encontradas com apenas um registro confirmaram as da literatura (B+UVGR- e BG+UVR-, ver tabela 5). O tipo de oponência G+UVBR- descrito anteriormente não foi encontrado neste estudo, contudo as oponências UVGR+B-, UVR+BG-, UV+BGR- e UVG+BR- ainda não tinham sido descritas. Com a junção dos estudos anteriores (VENTURA *et al.*, 2001; ZANA *et al.*, 2001) com o presente trabalho cinco canais de oponência podem ser formados: UVBG/R; UVB/GR; UVGR/B; UVR/BG; UV/BGR.

Tabela 6. Compilação das oponências espectrais e tipos morfológicos de células ganglionares.

Presente estudo		Tipos de Resposta				Ventura <i>et al.</i> , 1999	
Tipo Morfológico	Registradas	UV	B	G	R	Registradas	Tipo Morfológico
G21	5	-	-	-	+	3	G21
	3	+	+	+	-	1	
G17; G20	6	-	-	+	+	2	G15
	2	+	+	-	-	1	
	2	+	-	+	+	*	
	1	-	+	-	-	1	
	1	+	-	-	+	*	
	1	-	+	+	-	2	
	3	+	-	-	-	*	
G24	2	-	+	+	+	4	
	1	+	-	+	-	*	
	*	-	-	+	-	1	

Legenda:

+ = Despolarização

- = Hiperpolarização

* = oponências encontradas em apenas um dos estudos

Quanto à morfologia das células oponentes um dado muito satisfatório foi a confirmação do tipo morfológico G21, como sendo uma célula oponente (R+UVBG-) por ambos os trabalhos, o presente estudo e Ventura e colaboradores (2001), Originalmente a

célula G21 havia sido classificada como sendo uma célula não-cromática do tipo ON-OFF (AMMERMÜLLER *et al.*, 1995).

Três tipos morfológicos foram identificados com oponência cromática do tipo GR+UVB- (G15, G17, G18), sendo que célula G17 não foi classificada como uma célula cromática por Ammermüller e colaboradores (1995), contudo os autores relatam que nos testes de oponência cromática no centro do campo receptivo a célula respondeu com despolarizações transientes ON-OFF nos estímulos verde e vermelho, a estimulação com luz azul promoveu apenas respostas transientes OFF. As características fisiológicas das respostas da célula registrada e marcada são muito semelhantes ao descrito acima, o que corrobora os dados morfológicos (Figura 20).

Outra célula identificada foi a G18, esta célula originalmente foi descrita com oponência do tipo GR+B-, com oponência na periferia do campo receptivo e não-oponente no centro do campo receptivo (AMMERMÜLLER *et al.*, 1995). Em nosso estudo a oponência espectral (GR+UVB-) foi obtida tanto no centro como na periferia do campo receptivo sob estimulação de alta intensidade no dois casos (Figura 18). A diferença no tipo de resposta obtida pelos dois trabalhos pode provavelmente estar relacionada com o tamanho do estímulo para estimulação do centro do campo receptivo. Nossa área de estimulação foi de 700 μm enquanto que Ammermüller e colaboradores (1995) usaram uma área de 200 μm . Neste caso, pode-se imaginar que nossa área de estimulação foi grande o suficiente para ativar a periferia do campo receptivo da célula G18 e suprimir a resposta do centro, por outro a área de 200 μm poderia ser muito pequena para ativar completamente o campo centro do campo receptivo não permitindo que ocorresse, assim, a resposta cromática da célula.

A última célula ganglionar oponente identificada foi a tipo G24 com oponência cromática do tipo BGR+UV-. Neste caso não houve concordância do tipo de oponência espectral com os relatos anteriores, visto que essa célula foi descrita primeiramente como

R+BG- (AMMERMÜLLER *et al.*, 1995). Neste caso, apenas as características morfológicas serviram como base para a identificação da célula. Na figura 44 mostramos a célula G24 descrita por Ammermüller e colaboradores (1995) e a célula marcada no presente estudo. Existe grande semelhança no tamanho e no arranjo assimétrico da arborização dendrítica. Além disso, ambas têm estratificação nas sublâminas s1, s4-5.

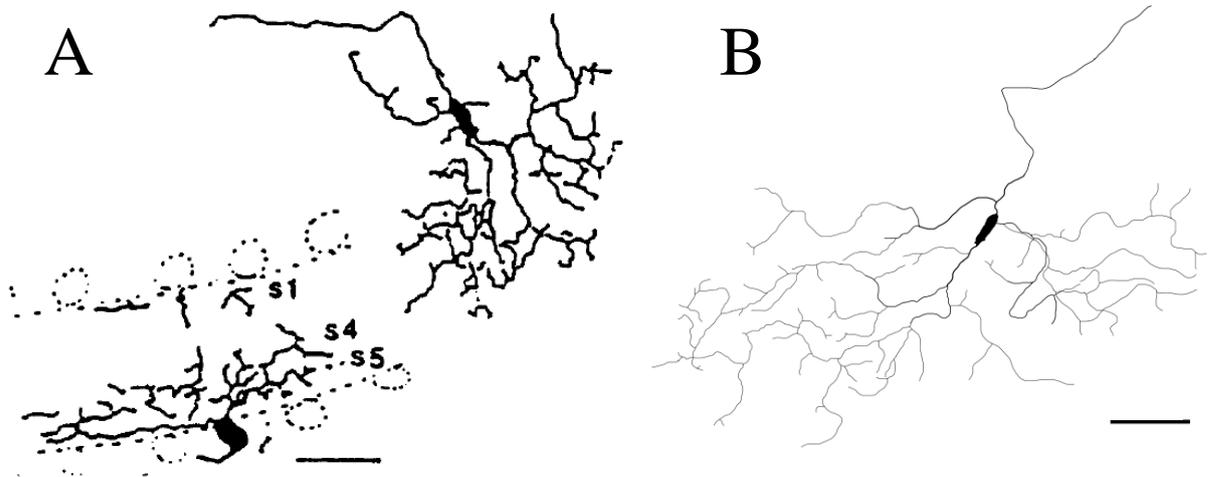


Figura 43. Desenho de duas células classificadas como G21. (A) Desenho em câmara clara da célula ganglionar G21 marcada com Lucifer-yellow. As ilustrações foram feitas tanto em seções radiais quanto em montagens plenas (AMMERMÜLLER *et al.*, 1995). (B) Ilustração da célula registrada e marcada no presente estudo. (Escala = 25 μ m)

4.4. FUNÇÃO DA VISÃO NO ULTRAVIOLETA

A função da visão no UV ainda permanece pouco esclarecida na tartaruga. Em outras espécies de vertebrados estudos comportamentais têm mostrado diferentes utilizações da discriminação da luz ultravioleta. Em pássaros a presença do pigmento UV está relacionada, particularmente em passeriformes, com um papel adaptativo na seleção de parceiros (HUNT *et al.*, 2001), nesses animais tem sido demonstrado que a refletância da plumagem é um importante fator na escolha dos machos pelas fêmeas. Existem também

evidências que a sensibilidade ao ultravioleta é importante em algumas espécies para o forrageamento, na detecção de presas por gaviões (VIITALA *et al.*, 1995) e para a coleta de néctar em beija-flor (GOLDSMITH, 1980; VENTURA e TAKASE, 1994).

Na tartaruga podemos imaginar, por exemplo, que uma comparação dos sinais dos cones UV e B pode ser uma boa alternativa para a codificação espectral em comprimentos de onda curtos. Alternativamente, se pensarmos que cones UV e B estão em número muito reduzido quando comparado a população de cones G e R parece ser razoável pensar que o sistema visual em baixas intensidades some as entradas UV e B reduzindo um sistema tetracromata para um sistema de visão tricromata mas com alta sensibilidade para estímulos de comprimentos de onda curtos, permitindo assim uma melhor comparação com as entradas dos outros cones (OSORIO *et al.*, 1999). Essa estratégia seria vantajosa em baixas intensidades de iluminação, visto que em baixas intensidades o sinal cromático UV-S é relativamente ruído (VOROBYEV *et al.*, 1998). Peixes como o *Carassius auratus* tornam-se tricromatas em intensidades baixas, devido ao baixo sinal de cones R (talvez devido a água absolver fortemente luz vermelha (NEUMEYER & ARNOLD, 1989)).

Em nossos achados mostramos evidências que podem existir pelo menos cinco tipos de canais (combinações completamente opostas: UVBG/R; UVB/RG; UVGR/B; UVR/BG; e UV/BGR) que podem ser usados separadamente como mecanismos de oponência. Uma investigação completa das características cromáticas do habitat da tartaruga é necessária para uma compreensão mais completa da utilização desses canais de cor.

4.5. ESPAÇO DE COR HIPOTÉTICO DE UM SISTEMA TETRACROMATA

O espaço de cor é uma representação gráfica construída a partir das funções de sensibilidade espectral dos cones. Qualquer cor pode ser representada dentro desse espaço.

O sistema de representação de cores de primatas do velho mundo (tricromatas), principalmente o humano, é sem dúvida o mais conhecido e sobre o qual a maior parte da teorização sobre visão de cores está baseada. Entretanto, os sistemas de entrada espectral da abelha e do peixe dourado também foram muito estudados (BACKHAUS & MENZEL, 1987; BACKHAUS, 1992; CHITTKA *et al.*, 1994; NEUMEYER, 1992).

Qualquer que seja a origem dos dados de sensibilidade espectral, quando a base do espaço de cores é a absorção espectral dos fotorreceptores, o efeito de qualquer luz colorida sobre os três fotopigmentos pode ser traçado sobre um sistema de coordenadas tridimensional, consistindo em três eixos ortogonais nas quais as unidades correspondem a três valores de absorção relativa, referentes aos cones R, G e B, no caso de primatas. Em termos de sensibilidade relativa, qualquer luz colorida pode dessa maneira ser representada por um ponto nesse plano, representado como um triângulo de cor (FEITOSA-SANTANA *et al.*, 2006).

No caso de nosso animal de estudo (tetracromata) é necessário estender a representação gráfica do diagrama para um sistema visual tetracromático hipotético, ou seja, como para 3 fotopigmentos tem-se uma representação na forma de um triângulo, no caso de quatro fotopigmentos (cone R, G, B e UV) pode-se representar o diagrama de cromaticidade na forma de um tetraedro (NEUMEYER & ARNOLD, 1989; GOLDSMITH, 1990). Esse exercício gráfico foi proposto por Goldsmith (1990) para espécies tetracromatas de aves e répteis.

Na figura 44, mostramos o espaço de cor hipotético proposto para a tartaruga, neste gráfico foram assumidos valores de sensibilidade espectral para os cones UV, B, G e R de 370 450, 520 e 620 nm, respectivamente. Essa representação do espaço receptor leva para uma interessante reflexão que se torna evidente com o resultado do exercício gráfico na comparação do espaço de cor proposto para humanos e para a tartaruga. Em um sistema

tricromata as misturas de cores plotadas em pontos entre o eixo azul vermelho no lócus espectral correspondem a cores não-espectrais que podemos perceber como púrpuras (Figura 44A). Olhando para o gráfico da figura 44A e B é sugerido que em um sistema tetracromata devem existir dois conjuntos adicionais de cores não espectrais plotadas ao longo das trajetórias UV-L e UV-M (GOLDSMITH, 1990). Nossos dados experimentais sugerem que existe suporte neural para a discriminação para essas cores localizadas nesses loci não espectrais, contudo experimentos comportamentais para demonstrar a discriminação dessas cores e qual o significado biológico das mesmas ainda não foram realizados nesta espécie.

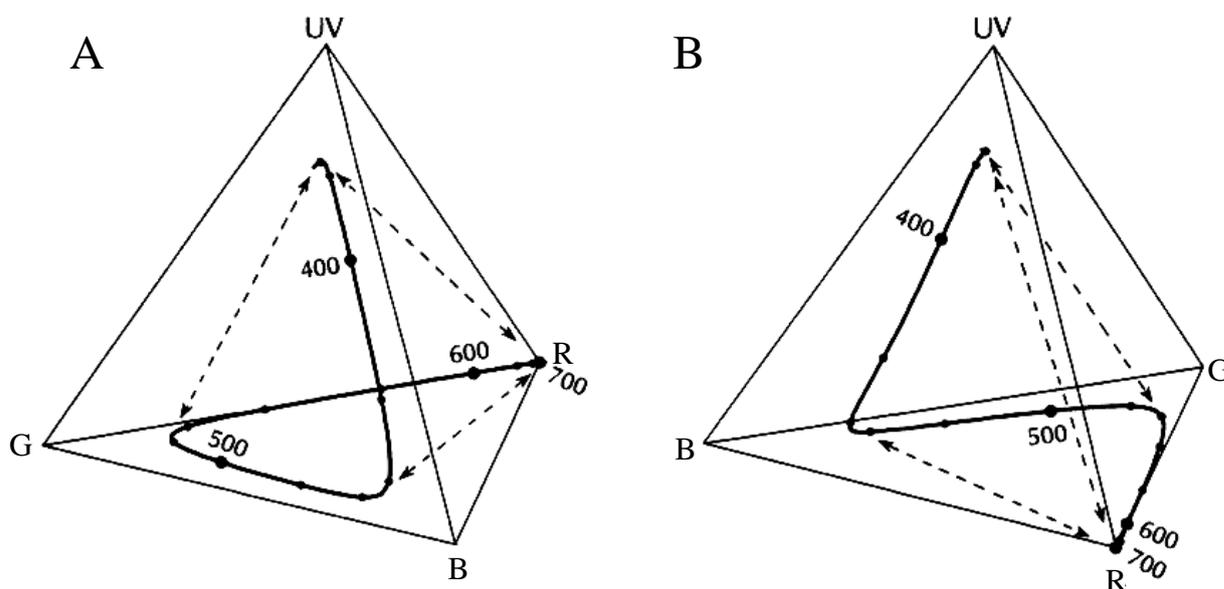


Figura 44. Representação gráfica do espaço de cor da tartaruga. (A) Sistema visual tetracromata representado por um tetraedro. Este exemplo está baseado sobre as estimativas das sensibilidades dos receptores da tartaruga (GOLDSMITH, 1990). A curva dentro do tetraedro (linha contínua) é o lócus calculado do espectro. Como sugerido pela linha tracejada, em um sistema tetracromata deve ser caracterizado não por uma mais por três conjuntos de cores não espectrais formadas pela mistura do UV e verde, UV e vermelho e azul e vermelho. (B) Rotação do tetraedro possibilitando uma outra perspectiva do espaço de cor.

5. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo confirmam a participação do canal UV no processamento de oponência cromática na retina interna da tartaruga;

Oito das 14 possíveis combinações cromáticas foram encontradas em trabalho anterior (VENTURA *et al.*, 2001), sete das quais foram confirmadas neste trabalho. Em adição, quatro novos tipos foram reportados, formando um total de 12 combinações cromáticas;

Esse estudo mostra que a tartaruga tem o mecanismo fisiológico para reprodução de quase todas as combinações cromáticas possíveis em um sistema tetracromata. Assim como, estende o corpo de conhecimento da fisiologia da codificação cromática com a adição da estimulação do UV, e aos correlatos morfológicos de células ganglionares da tartaruga.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHNELT, P. K., KOLB, H. The Mammalian Photoreceptor Mosaic-adaptive Design. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 19, p. 711-777, 2000.

AMMERMULLER, J., ITZHAKI, A., WEILER, R., PERLMAN, I. UV-sensitive input to horizontal cells in the turtle retina. **European Journal of Neuroscience**, v. 10, p. 1544-1552, 1998.

AMMERMULLER, J., KOLB, H. The organization of the turtle inner retina. I. ON- and OFF-center pathways. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 358, p. 1-34, 1995.

AMMERMULLER, J., KOLB, H. Functional architecture of the turtle retina. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 15, p. 393-433, 1996.

AMMERMULLER, J., MULLER, J. F., KOLB, H. The organization of the turtle inner retina. II. Analysis of color-coded and directionally selective cells. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 358, p. 35-62, 1995.

AMMERMULLER, J., WEILER, R. Physiological and morphological characterization of OFF-center amacrine cells in the turtle retina. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 273, p. 137-148, 1988.

AMTHOR, F. R., TAKAHASHI, E. S., OYSTER, C. W. Morphologies of rabbit retinal ganglion cells with complex receptive fields. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 280, p. 97-121, 1989.

ARNOLD, K., NEUMEYER, C. Wavelength Discrimination in the Turtle *Pseudemys Scripta Elegans*. **Vision Research**, v. 27, p. 1501-1511, 1987.

ARRESE, C. A., HART, N. S., THOMAS, N., BEAZLEY, L. D., SHAND, J. Trichromacy in Australian marsupials. **Current Biology**, v. 12, p. 657-660, 2002.

ARRESE, C. A., ODDY, A. Y., RUNHAM, P. B., HART, N. S., SHAND, J., HUNT, D. M., BEAZLEY, L. D. Cone topography and spectral sensitivity in two potentially trichromatic marsupials, the quokka (*Setonix brachyurus*) and quenda (*Isoodon obesulus*). **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 272, p. 791-796, 2005.

BACKHAUS, W. The Bezold-Brücke effect in the color vision system of the honeybee. **Vision Research**, v. 32, p. 1425-1431, 1992.

BACKHAUS, W., MENZEL, R. Color distance derived from a receptor model of color vision in the honeybee. **Biological Cybernetics**, v. 55, p. 321-331. 1987.

BORG-GRAHAM, L. J. The computation of directional selectivity in the retina occurs presynaptic to the ganglion cell. **Nature Neuroscience**, v. 4, p. 176-183, 2001.

BOWLING, D. B. Light responses of ganglion cells in the retina of the turtle. **Journal of Physiology-London**, v. 299, p. 173-196, 1980.

CHITTKA, L., SHMIDA, A., TROJE, N., MENZEL, R. Ultraviolet as a component of flower reflections, and the colour perception of Hymenoptera. **Vision Research**, v. 34, p. 1489-1508, 1994.

DACEY, D.M., LEE, B.B. Functional architecture of cone signal pathways in the primate retina. In: Gegenfurtner, K.R. and Sharpe, L.T. (Eds.), **Color Vision: From genes to perception**. Cambridge: Cambridge University Press, p. 181-202, 1999.

DARWIN, C. R. Difficulties on Theory. in: Murray, J. (Ed), **On the Origin of Species by Means of Natural Selection**. London, p. 171-206, 1859.

DE LIMA, S. M., AHNELT, P. K., CARVALHO, T. O., SILVEIRA, J. S., ROCHA, F. A., SAITO, C. A., SILVEIRA, L. C. Horizontal cells in the retina of a diurnal rodent, the agouti (*Dasyprocta aguti*). **Visual Neuroscience**, v. 22, p. 707-20, 2005.

DEARWORTH, J. R. JR., GRANDA, A. M. Multiplied functions unify shapes of ganglion-cell receptive fields in retina of turtle. **Journal of Vision**, v. 2, p. 204-217, 2002.

EBREY, T., KOUTALOS, Y. Vertebrate photoreceptors. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 20, p. 49-94, 2001.

EHINGER, B., OTTERSEN, O. P., STORM-MATHISEN, J., DOWLING, J. E. Bipolar cells in the turtle retina are strongly immunoreactive for glutamate. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, p. 8321-8325, 1988.

FEITOSA-SANTANA, C., OIWA, N. N., COSTA, M. F., TIEDEMANN, K. B., SILVEIRA, L. C. L., VENTURA, D. F. Espaço de cores. **Psicologia USP**, v. 17, p. 35-63, 2006.

FUORTES, M. G., SIMON, E. J. Interactions leading to horizontal cell responses in the turtle retina. **Journal of Vision**, v. 240, p. 177-198, 1974.

GOEDE, P., KOLB, H. Identification of the synaptic pedicles belonging to the different spectral types of photoreceptor in the turtle retina. **Vision Research**, v. 34, p. 2801-2811, 1994.

GOLDSMITH, T. H. Hummingbirds see near ultraviolet light. **Science**, v. 207, p. 786-788, 1980.

GOLDSMITH, T.H. Optimization, constraint, and history in the evolution of eyes. **Quarterly Review of Biology**, v. 65, p. 281-322. 1990.

GRANDA, A. M., DEARWORTH, J. R. JR., SUBRAMANIAM, B. Balanced interactions in ganglion-cell receptive fields. **Visual Neuroscience**, v. 16, p. 319-332, 1999.

GRANDA, A. M., DVORAK, C. A. The Visual System in the Vertebrates. in: Crescitelli, F. (ed). **Handbook of Sensory Physiology**, p. 451-495. Berlin: Springer Verlag, 1977.

GRANDA, A. M., FULBROOK, J. E. Classification of turtle retinal ganglion cells. **Journal of Neurophysiology**, v. 62, p. 723-737, 1989.

HAVERKAMP, S., MOCKEL, W., AMMERMULLER, J. Different types of synapses with different spectral types of cones underlie color opponency in a bipolar cell of the turtle retina. **Visual Neuroscience**, v. 16, p. 801-809, 1999.

HART, N.S. The Visual Ecology of Avian Photoreceptors. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 20, p. 675-703, 2001

HURD, L. B., ELDRED, W. D. Synaptic microcircuitry of bipolar and amacrine cells with serotonin-like immunoreactivity in the retina of the turtle, *Pseudemys scripta elegans*. **Visual Neuroscience**, v. 10, p. 455-471, 1993.

JACOBS, G. H. The distribution and nature of colour vision among the mammals. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 68, p. 413-471, 1993.

JENSEN, R. J., DEVOE, R. D. Ganglion cells and (dye-coupled) amacrine cells in the turtle retina that have possible synaptic connection. **Brain Research**, v. 240, p. 146-150, 1982.

JENSEN, R. J., DEVOE, R. D. Comparisons of directionally selective with other ganglion cells of the turtle retina: intracellular recording and staining. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 217, p. 271-287, 1983.

JOSELEVITCH, C., KAMERMANS, M. Interaction between rod and cone inputs in mixed-input bipolar cells in goldfish retina. **Journal of Neuroscience Research**, (Articles online in advance of print), 2007.

KITTLA, C. A., GRANDA, A. M. Functional morphologies of retinal ganglion cells in the turtle. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 350, p. 623-645, 1994.

KOLB, H. The morphology of the bipolar cells, amacrine cells and ganglion cells in the retina of the turtle *Pseudemys scripta elegans*. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences**, v. 298, p. 355-393, 1982.

KOLB, H. The Architecture of Functional Neural Circuits in the Vertebrate Retina (Vol 35, Pg 2397, 1994). **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 35, p. 3576, 1994.

KOLB, H., JONES, J. The distinction by light and electron microscopy of two types of cone containing colorless oil droplets in the retina of the turtle. **Vision Research**, v. 27, p. 1445-1458, 1987.

KOLB, H., NELSON, R., AHNELT, P., CUENCA, N. Cellular organization of the vertebrate retina. **Progress in Brain Research**, v. 131, p. 3-26. 2001.

KOLB, H., PERLMAN, I., NORMANN, R. A. Neural organization of the retina of the turtle *Mauremys caspica*: a light microscope and Golgi study. **Visual Neuroscience**, v. 1, p. 47-72, 1988.

LEE, B. B., SILVEIRA, L. C. L., YAMADA, E. S., HUNT, D. M., KREMERS, J., MARTIN, P. R., TROY, J. B., DA SILVA, M. Visual responses of ganglion cells of a New-World primate, the capuchin monkey, *Cebus apella*. **Journal of Physiology-London**, v. 528, p. 573-590, 2000.

LEEPER, H. F. Horizontal cells of the turtle retina. I. Light microscopy of Golgi preparations. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 182, p. 777-793, 1978a.

LEEPER, H. F. Horizontal cells of the turtle retina. II. Analysis of interconnections between photoreceptor cells and horizontal cells by light microscopy. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 182, p. 795-809, 1978b.

LEEPER, H. F., COPENHAGEN, D. R. Horizontal cells in turtle retina: structure, synaptic connections, and visual processing. **Progress in Clinical and Biological Research**, v. 13, p. 77-104, 1982.

LIPETZ, L. E. A new method for determining peak absorbance of dense pigment samples and its application to the cone oil droplets of *Emydoidea blandingii*. **Vision Research**, v. 24, p. 567-604, 1984.

LOEW, E. R., GOVARDOVSKII, V. I. Photoreceptors and visual pigments in the red-eared turtle, *Trachemys scripta elegans*. **Visual Neuroscience**, v. 18, p. 753-757, 2001.

MARCHIAFAVA, P. L. The responses of retinal ganglion cells to stationary and moving visual stimuli. **Vision Research**, v. 19, p. 1203-1211, 1979.

MARCHIAFAVA, P. L. An "antagonistic" surround facilitates central responses by retinal ganglion cells. **Vision Research**, v. 23, p. 1097-1099, 1983.

MARCHIAFAVA, P. L., WAGNER, H. G. Interactions leading to colour opponency in ganglion cells of the turtle retina. **Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences**, v. 211, p. 261-267, 1981.

MILLER, W. H., HASHIMOTO, Y., SAITO, T., TOMITA, T. Physiological and morphological identification of L- and C-type S-potentials in the turtle retina. **Vision Research**, v. 13, p. 443-447, 1973.

NATHANS, J., THOMAS, D., HOGNESS, D. S. Molecular-Genetics of Human Color-Vision - the Genes Encoding Blue, Green, and Red Pigments. **Science**, v. 232, p. 193-202, 1986.

NEUMEYER, C. Tetrachromatic color vision in goldfish: Evidence from colour mixing experiments. **The Journal of Comparative Physiology A**, v. 171, p. 639–649, 1992.

NEUMEYER, C., ARNOLD, K., Tetrachromatic color vision in the goldfish becomes trichromatic under white adaptation light of moderate intensity. **Vision Research**, v. 29, p. 1719-27, 1989.

OHTSUKA, T. Spectral sensitivities of seven morphological types of photoreceptors in the retina of the turtle, *Geoclemys reevesii*. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 237, p. 145-154, 1985.

OHTSUKA, T., KOUYAMA, N. Physiological and morphological studies of cone-horizontal cell connections in the turtle retina. **Neuroscience Research. Supplement**, v. 4, p. S69-S84, 1986.

OSORIO, D., VOROBYEV, M., JONES, C. D. Colour vision of domestic chicks. **The Journal of Experimental Biology**, v. 202, p. 2951-2959, 1999.

RAMÓN Y CAJAL, S. La Cellule. Traduzido para o inglês (1972): Thorpe, S.A., Glickstein, M. (trad.). **The structure of the retina**. Springfield, 1892. 196 p.

ROWE, M.H. Trichromatic Color Vision in Primates. **News Physiology Science**, v. 17, p. 93-98, 2002.

SCHUTTE, M., WEILER, R. Mesencephalic innervation of the turtle retina by a single serotonin-containing neuron. **Neuroscience Letters**, v. 91, p. 289-294, 1988.

SERNAGOR, E., GRZYWACZ, N. M. Emergence of complex receptive field properties of ganglion cells in the developing turtle retina. **Journal of Neurophysiology**, v. 73, p. 1355-1364, 1995.

SILVEIRA, L. C. L., LEE, B. B., YAMADA, E. S., KREMERS, J., HUNT, D. M., MARTIN, P. R., GOMES, F. L. Ganglion cells of a short-wavelength-sensitive cone pathway in New World monkeys: Morphology and physiology. **Visual Neuroscience**, v. 16, p. 333-343, 1999.

SILVEIRA, L. C. L., SAITO, C. A., LEE, B. B., KREMERS, J., DA SILVA, M., KILAVIK, B. E., YAMADA, E. S., PERRY, V. H. Morphology and physiology of primate M- and P-cells. **Roots of Visual Awareness**, v. 144, p. 21-46, 2003.

SILVEIRA, L. C., YAMADA, E. S., PICANCO-DINIZ, C. W. Displaced horizontal cells and biphaxiform horizontal cells in the mammalian retina. **Visual Neuroscience**, v. 3, p. 483-8, 1989.

TAUCHI, M. Displaced and indoleamine-accumulating bipolar cells in the turtle retina. **Neuroscience Research. Supplement**, v. 10, p. S57-S66, 1989.

TWIG, G., PERLMAN, I. Homogeneity and diversity of color-opponent horizontal cells in the turtle retina: Consequences for potential wavelength discrimination. **Journal of Vision**, v. 4, p. 403-414, 2004.

VENTURA, D. F., DE SOUZA, J. M., DEVOE, R. D., ZANA, Y. UV responses in the retina of the turtle. **Visual Neuroscience**, v. 16, p. 191-204, 1999.

VENTURA, D. F., TAKASE, E. Ultraviolet color discrimination in the hummingbird. In: Investigative Ophthalmology & Visual Science Annual Meeting, 1994, Sarasota, Florida. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 35, p. 2168-2168, 1994.

VENTURA, D. F., ZANA, Y., DE SOUZA, J. M., DEVOE, R. D. Ultraviolet colour opponency in the turtle retina. **Journal of Experimental Biology**, v. 204, p. 2527-2534, 2001.

VIITALA, J., KORPIMAKI, E., PALOKANGAS, P. KOIVULA, M. Attraction of kestrels to vole scent marks visible in ultraviolet light. **Nature**, v. 373, p. 425–427, 1995.

VOROBYEV, M., OSORIO, D. Receptor noise as a determinant of colour thresholds. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 265, p. 351-358, 1998.

WALLS, G. L. The visual process. B – Photopic vision. In: **The vertebrate eye and its adaptative radiation**. Bloomfield Hills: Cranbook Institute of Science, p. 81-100, 1942.

WEILER, R., AMMERMULLER, J. Immunocytochemical localization of serotonin in intracellularly analyzed and dye-injected ganglion cells of the turtle retina. **Neuroscience Letters**, v. 72, p. 147-152, 1986.

WEILER, R., SCHUTTE, M. Morphological and pharmacological analysis of putative serotonergic bipolar and amacrine cells in the retina of a turtle, *Pseudemys scripta elegans*. **Cell and Tissue Research**, v. 241, p. 373-382, 1985.

YAZULLA, S. Cone input to bipolar cells in the turtle retina. **Vision Research**, v. 16, p. 737-744, 1976.

YOKOYAMA, S. Molecular evolution of color vision in vertebrates. **Gene**, v. 300, p. 69-78, 2002.

ZANA, Y., VENTURA, D. F., DE SOUZA, J. M., DEVOE, R. D. Tetrachromatic input to turtle horizontal cells. **Visual Neuroscience**, v. 18, p. 759-765, 2001.

ANEXO I

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

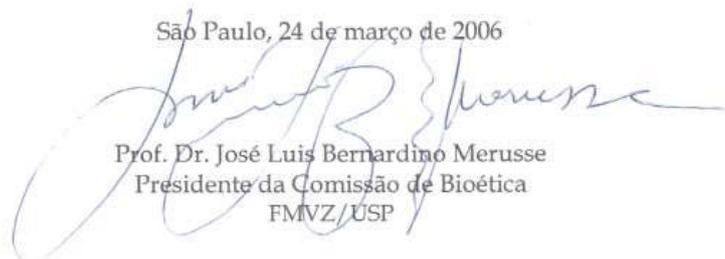
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Oponência espectral em células ganglionares na retina da tartaruga (*Trachemys scripta elegans*) envolvendo estimulação tetracromática", protocolo nº799/2005, utilizando 60 (sessenta) tartarugas, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Dora Selma Fix Ventura, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Spectral opponency in ganglion cells in the retina of turtle (*Trachemys scripta elegans*) with tetrachromatic stimulus", protocol number 799/2005, utilizing 60 (sixty) turtles, under the responsibility of Profa. Dra. Dora Selma Fix Ventura, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 24 de março de 2006



Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

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](#)