

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA ELÉTRICA E DE COMPUTAÇÃO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA**

TESE DE DOUTORADO

**UMA TÉCNICA PARA O ESTUDO DO SINAL ÓPTICO INTRÍNSECO
DA DEPRESSÃO ALASTRANTE EM RETINA DE AVES**

MÁRIO ANTÔNIO DUARTE

ORIENTADOR: Prof. Dr. Antônio-Carlos Guimarães de Almeida
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. José Wilson Magalhães Bassani

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Antônio-Carlos Guimarães de Almeida
Prof. Dr. Hiss Martins-Ferreira
Prof. Dr. Antônio Fernando Catelli Infantosi
Prof. Dr. Paulo Alberto Paes Gomes
Profa. Dra. Rosana Almada Bassani
Prof. Dr. Eduardo Tavares Costa
Prof. Dr. Sérgio Santos Mühlen

CURSO: Engenharia Elétrica

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Engenharia Biomédica

Tese de doutorado apresentada à Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, como requisito para obtenção do título de Doutor em Engenharia Elétrica

Campinas, novembro de 2000
SP - Brasil

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

D85u Duarte, Mário Antônio
Uma técnica para o estudo do sinal óptico intrínseco da
depressão alastrante em retina de aves / Mário Antônio
Duarte.--Campinas, SP: [s.n.], 2000.

Orientadores: Antônio-Carlos Guimarães de Almeida e
José Wilson Magalhães Bassani.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Elétrica e de
Computação.

1. Retina. I. Almeida, Antônio-Carlos Guimarães de.
II. Bassani, José Wilson Magalhães. III. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Elétrica e
de Computação. IV. Título.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Antônio-Carlos Guimarães de Almeida, orientador deste trabalho, pelo exemplo profissional e pela valiosa e indispensável orientação.

Ao Prof. José Wilson Magalhães Bassani, co-orientador, também pelo seu exemplo profissional e pelo apoio institucional que proporcionou o prosseguimento e desenvolvimento deste trabalho.

À Eloisa pelo carinho e pela atenção com que trata todos os alunos, técnicos, colegas de trabalho e professores.

Aos irmãos e sobrinhos Valdete, Édna, Robson, Brenda, Walter, Marlene e Saula pela extraordinária ajuda familiar nos momentos mais difíceis no início do trabalho. Sempre prontos, atenciosos e amáveis para comigo. Foram muito mais do que família.

Aos amigos Fernando Lobo, Hewerson Zansávio Teixeira, Rodrigo Seixas de Carvalho e Antônio Márcio Rodrigues pela inestimável e agradável companhia no laboratório e pelo desenvolvimento dos softwares para simulação da óptica geométrica e saída gráfica.

À Mirella, Lídia, Bruno e Antônio (parceiros) pelo cuidado e carinho em todos os momentos da jornada.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho.

RESUMO

Neste trabalho, apresenta-se uma técnica óptica para o estudo da depressão alastrante em retina de ave *in vitro*. O método permite o registro do espalhamento de luz, oriundo de uma fonte de *laser*, em configuração cuja iluminação é semelhante àquela denominada campo escuro, na qual as camadas do tecido produzem uma imagem funcional durante o fenômeno. As camadas podem ser visualizadas no tecido intacto sem qualquer corte histológico. O método mostrou ser útil para medidas de diferentes variáveis tais como o potencial extracelular simultaneamente com a imagem funcional em alta resolução espacial. Um método de processamento de imagem foi utilizado para compactar, em uma simples imagem, as informações sobre a evolução temporal e espacial do espalhamento de luz em todas as camadas da retina. A técnica permitiu a visualização do espalhamento de luz na camada plexiforme interna, onde se encontra grande parte do espalhamento durante a onda de depressão alastrante. A razão entre os dois picos máximos do sinal óptico concomitante ao fenômeno foi estudada com duas fontes de laser de comprimentos de onda nas faixas do vermelho e do verde. Os resultados experimentais apontaram uma dependência desta razão com o comprimento de onda da luz incidente no tecido.

ABSTRACT

A special optical approach for the study of spreading depression in isolated retina is presented in this work. The method allowed to register the laser light scattered, in a dark field configuration, through each layer of the tissue producing a functional image during spreading depression. The layers could be seen in the intact tissue without the need of any histological cut. The method could be useful for the measurements of different variables, such extracellular potential, simultaneously with the functional image with a high spatial resolution. An image processing technique was used to compact in a single image the information about the spatial and temporal evolution of light scattering through retinal layers. The technique allowed the visualization of light scattered in the inner plexiform layer, where most of the light scattering takes place during spreading depression. The relationship between two peaks of light scattering during the phenomenon was studied at two wavelengths (red and green) of the dissimilar laser source. It was shown that this relationship is dependent of the wavelength.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO | 01 |
| I.1 - HISTÓRICO | 01 |
| I.2 - OBJETIVO | 06 |
| | |
| CAPÍTULO II - CONCEITOS BÁSICOS E A RETINA COMO MODELO EXPERIMENTAL | 07 |
| II.1 - A RETINA | 07 |
| II.2 - A DEPRESSÃO ALASTRANTE E A RETINA | 10 |
| II.3 - ESPALHAMENTO DE LUZ NA RETINA DURANTE A DA | 15 |
| II.3.1 – EFEITOS DA OSMOLARIDADE SOBRE O ESPALHAMENTO DE LUZ | 17 |
| II.4 - VELOCIDADE DE PROPAGAÇÃO DA ONDA DE DA NA RETINA | 19 |
| | |
| CAPÍTULO III – MATERIAIS E MÉTODOS | 21 |
| III.1 – ANIMAIS | 21 |
| III.2 - SOLUÇÕES FISIOLÓGICAS | 21 |
| III.3 - PREPARAÇÃO DA RETINA | 21 |
| III.4 - MONTAGEM EXPERIMENTAL COM A RETINA E INDUÇÃO DA ONDA DE DA | 22 |
| III.5 - DESCRIÇÃO DA INSTRUMENTAÇÃO (MONTAGEM EXPERIMENTAL) | 24 |
| III.6 – PROCEDIMENTO PARA PERFUSÃO DE SOLUÇÃO NUTRIENTE NOS EXPERIMENTOS DE MEDIÇÕES DA ONDA DE DEPRESSÃO ALASTRANTE COM LASER | 28 |
| III.7 – PROCEDIMENTO PARA PERFUSÃO DE SOLUÇÃO NUTRIENTE NOS EXPERIMENTOS DE MEDIÇÃO DE TRANSMITÂNCIA E ESPALHAMENTO DE LUZ COM DIFERENTES OSMOLARIDADES | 29 |
| III.7.1 - ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO EXTRACELULAR DE NaCl DURANTE A PERFUSÃO | 29 |
| III.8 – PROCEDIMENTOS COMPUTACIONAIS | 30 |
| III.8.1 - PROCESSAMENTO DE IMAGEM | 31 |
| III.8.2 - ESTIMATIVA DA VELOCIDADE DA FRENTE DE ONDA | 33 |
| III.8.3 - CONSTRUÇÃO DA ETEL | 33 |
| III.8.4 – SEQUÊNCIA DO SINAL ÓPTICO EM FUNÇÃO DO TEMPO | 35 |
| III.8.5 – RAZÃO ENTRE OS PICOS MÁXIMOS DO SINAL ÓPTICO INTRÍNSECO | 36 |

| | |
|--|-----------|
| CAPÍTULO IV - RESULTADOS EXPERIMENTAIS | 37 |
| IV.1 - ESTUDOS DA ONDA DE DA COM <i>LASER</i> | 37 |
| IV.1.1 - ESPALHAMENTO DE LUZ NAS CAMADAS DA RETINA | 37 |
| IV.1.2 - VARIAÇÃO DA ESPESSURA DA RETINA DURANTE A ONDA DE DA | 40 |
| IV.1.3 - VELOCIDADE DA FRENTE DE ONDA DE DA NA RETINA | 41 |
| IV.1.4 - RAZÃO ENTRE OS PICOS b E d DO SINAL ÓPTICO | 43 |
| IV.2 - INFLUÊNCIA DA OSMOLARIDADE EXTRACELULAR SOBRE ESPALHAMENTO DE LUZ | 45 |
| IV.2.1 - EXPERIMENTOS COM LUZ BRANCA TRANSMITIDA | 46 |
| IV.2.2 - EXPERIMENTOS COM <i>LASER</i> | 50 |
| IV.2.2.1 - VARIAÇÃO DA ESPESSURA DA RETINA | 52 |
| IV.3 - INJEÇÃO IONTOFORÉTICA DE K^+ | 54 |
| | |
| CAPÍTULO V - MODELO MATEMÁTICO E SIMULAÇÕES | 57 |
| V.1 – SIMULAÇÃO DO ESPALHAMENTO DE LUZ POR ÓPTICA GEOMÉTRICA | 58 |
| V.1.1 – DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO ALGORITMO DE SIMULAÇÃO | 59 |
| V.1.2 - RESULTADOS DA SIMULAÇÃO POR ÓPTICA GEOMÉTRICA | 63 |
| V.2 - SIMULAÇÃO DA TRANSMITÂNCIA DE LUZ | 71 |
| V.2.1 – FORMULAÇÃO MATEMÁTICA | 73 |
| V.2.2 – DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO ALGORITMO DE SIMULAÇÃO | 77 |
| V.2.3 – RESULTADOS DA SIMULAÇÃO DA TRANSMITÂNCIA | 78 |
| | |
| CAPÍTULO VI - DISCUSSÃO E CONCLUSÕES | 81 |
| VI.1 - MONTAGEM EXPERIMENTAL | 81 |
| VI.2 - ONDA DE DEPRESSÃO ALASTRANTE | 82 |
| VI.2.1 - RAZÃO ENTRE OS PICOS MÁXIMOS DO SINAL ÓPTICO | 83 |
| VI.3 - VELOCIDADE DA FRENTE DE ONDA | 85 |
| VI.4 - EXPERIMENTOS COM LUZ TRANSMITIDA E ESPALHADA | 86 |
| VI.5 - VARIAÇÃO DA ESPESSURA DA RETINA | 87 |
| VI.6 - SIMULAÇÃO | 89 |
| VI.6.1 - ÓPTICA GEOMÉTRICA | 89 |
| VI.6.2 - LUZ TRANSMITIDA | 91 |
| VI.7 - PROPOSTAS DE CONTINUIDADE | 92 |

| | |
|--|------------|
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 95 |
| APÊNDICE I - CONCEITOS BÁSICOS | 101 |
| AI.1 - ÓPTICA GEOMÉTRICA | 101 |
| AI.2 - TRATAMENTO DE IMAGENS | 105 |
| AI.3 - TRATAMENTO DE IMAGENS | 107 |
| APÊNDICE II - TRABALHO PUBLICADOS | 109 |

LISTA DE FIGURAS DO TEXTO

CAPÍTULO II

Figura II.1 - Imagem digitalizada das camadas da retina de ave.

Figura II.2 - Células de Müller e Imagem digitalizada das camadas da retina de ave.

Figura II.3 - Fotomicrografias da propagação da onda de DA na retina de ave.

Figura II.4 - Diagrama esquemático e estratificado da retina de ave.

Figura II.5 - Dinâmica iônica e do potencial extracelular durante onda de DA.

Figura II.6 - Morfologia padrão da seqüência do espalhamento de luz na IPL da retina.

Figura II.7 - Razão de intensidade relativa dos picos máximos do sinal óptico.

Figura II.8 - Efeito da variação da osmolaridade do meio extracelular sobre o sinal óptico durante a passagem da onda de DA.

CAPÍTULO III

Figura III.1 - Posicionamento da retina para experimentos de luz transmitida e espalhada.

Figura III.2 - Diagrama da montagem experimental para experimentos com iluminação com fonte de *laser*.

Figura III.3 - Diagrama do montagem experimental para experimentos com iluminação com fonte de luz branca.

Figura III.4 - Posicionamento da ponta da pipeta de medição de potencial dentro da IPL.

Figura III.5 - Diagrama do procedimento para determinação da velocidade da frente de onda de DA.

CAPÍTULO IV

Figura IV.1 - Imagem digitalizada da frente de onda de DA

Figura IV.2 - Imagem da evolução temporal e espacial do espalhamento de luz durante um evento de onda de DA.

Figura IV.3 - Registro do gráfico da intensidade do espalhamento de luz associado ao potencial DC extracelular.

Figura IV.4 - Localização do sinal óptico na IPL de uma retina.

Figura IV.5 - Evolução temporal e espacial da intensidade de luz espalhada mostrando variação da espessura da IPL.

Figura IV.6 - Evolução espaço temporal do espalhamento de luz em torno da IPL.

Figura IV.7 - Propagação da velocidade de uma frente de onda de DA.

Figura IV.8 - Propagação da velocidade de duas frentes de onda de DA em colisão.

Figura IV.9 - Razão média entre os picos **b** e **d** do sinal óptico para comprimentos de onda do laser incidente na faixa do vermelho e do verde.

Figura IV.10 - Variação da luz transmitida em função da osmolaridade extracelular variável.

Figura IV.11 - Variação da transmitância em função de NaCl.

Figura IV.12 - Variação da transmitância para seqüência de perfusão de solução hipo para hipertônica; repouso de duas horas e perfusão de solução hiper para hipotônica.

Figura IV.13 - Variação da luz espalhada média, na faixa do vermelho e do verde, na IPL.

Figura IV.14 - Evolução temporal e espacial da intensidade de luz espalhada mostrando variação da espessura da IPL.

Figura IV.15 - Injeção de potássio por iontoforese.

Figura IV.16 - Seqüência de imagens subseqüentes à injeção de potássio por iontoforese.

CAPÍTULO V

Figura V.1 - Representação geométrica da IPL por microregiões aleatórias.

Figura V.2 – Diagrama esquemático do algoritmo representativo da simulação da IPL através de modelagem por óptica geométrica.

Figura V.3 - Diagrama representativo da variação da estrutura do espaço extracelular.

Figura V.4 - Trajetórias de raios de luz dentro da IPL.

Figura V.5 - Projeção das trajetórias de raios incidentes em um cilindro tridimensional em planos bidimensionais.

Figura V.6 - Simulação do espalhamento de luz na IPL, em estrutura aleatória, para osmolaridade variável.

Figura V.7 - Simulação do espalhamento de luz na IPL, em estrutura lamelar, para osmolaridade variável.

Figura V.8 - Simulação da transmitância na IPL em função da osmolaridade e geometria.

Figura V.9 - Simulação da transmitância em função do ângulo azimutal de geometria.

Figura V.10 - Seqüência de definição das equações para simulação de transmitância.

Figura V.11 – Diagrama esquemático do algoritmo representativo da simulação da luz transmitida na IPL através da modelagem por uma família de curvas de distribuição normal.

Figura V.12 – Resultado da simulação da transmitância em função da osmolaridade extracelular e geometria.

APÊNDICE I

Figura AI.1 - Espectro eletromagnético com região de luz visível destacável.

Figura AI.2 - Reflexão e refração de um raio de luz ao atravessar meios com índices de refração diferentes.

Figura AI.3 - Dispersão da luz em um prisma em função do comprimento de onda da luz incidente.

LISTA DE TABELAS DO TEXTO

CAPÍTULO II

Tabela II.1 - Variações das concentrações iônicas no meio extracelular durante onda de DA na retina de ave.

CAPÍTULO IV

Tabela IV.1 - Variação da espessura da IPL em diferentes soluções de Ringer.

ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------------|--|
| α-NS | – Íon (α -naftaleno-sulfonato) |
| EPM | – Erro Padrão da Média |
| ETEL | – Evolução Temporal e Espacial do Espalhamento de Luz |
| HSI | – Sistema de imagens (<i>Hue, Saturation e Intensity</i>) |
| IOS | – Sinal Óptico Intrínseco (<i>Intrinsic Optical Signal</i>) |
| IPL | – Camada plexiforme interna (<i>Inner Plexiform Layer</i>) |
| PFT | – Perfil da Frente de Onda no Tempo |
| RGB | – Padrão de cores utilizado em imagens (<i>Red, Green, Blue</i>) |
| SAE | – Sistema Auxiliar de Experimento |
| SN | – Solução Nutriente Normal |
| SNC | – Sistema Nervoso Central |
| TEA⁺ | – Íon (Tetraetilamônio) |

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

I.1 - HISTÓRICO

O fenômeno da depressão alastrante (DA) foi primeiro descrito por Aristides Leão em 1944 (LEÃO, 1944), como sendo uma depressão da atividade elétrica espontânea no córtex cerebral de coelho, provocada por estimulação local, que lentamente se propagava para além da região de estímulo em todas as direções. A onda de DA foi caracterizada, principalmente, pela variação do potencial extracelular registrada em tecidos nervosos. Posteriormente, com a utilização de microeletrodos, comprovou-se que a onda de DA estava associada a uma despolarização extensiva das membranas de células neuronais e gliais, além de uma intensa movimentação iônica e de água entre os meios extra e intracelulares.

A partir da descoberta da onda de DA, vários pesquisadores começaram a investigar a natureza dos processos fisiológicos envolvidos neste fenômeno. Em 1956, Grafstein (GRAFSTEIN, 1956) utilizando microeletrodos, descobriu a ocorrência de uma rápida e intensa atividade elétrica neuronal à frente da onda de DA. A atividade, quanto mais intensa, mais se assemelhava às descargas convulsivas corticais, um indicador da natureza epiléptica desse fenômeno.

O trabalho de GOURAS (1958) já revela a presença de um sinal óptico concomitante à propagação da onda de DA. Seus estudos utilizavam a retina de rã como modelo experimental de tecido cortical para o estudo da atividade epiléptica.

Ciente do sinal óptico associado à onda de DA em retina, Martins-Ferreira, no início da década de 60 (DO CARMO, 1987), em seus estudos sobre a DA e a organização dos tecidos do Sistema Nervoso Central (SNC), obteve sucesso reproduzindo o fenômeno de Leão *in vitro*. Este pesquisador demonstrou que a onda de DA na retina de ave tem características similares às ondas de Leão que ocorriam em outras estruturas *in vivo* do sistema nervoso central.

Durante o desenvolvimento de uma solução nutriente apropriada à reprodutibilidade do fenômeno de DA, Martins-Ferreira (DO CARMO, 1987), como Gouras, verificou que este fenômeno poderia ser visto, em retina de ave, a olho nu ou com microscópio de baixa ampliação. O pesquisador observou uma onda “leitosa” cuja origem era a região de estimulação utilizada para deflagrar o fenômeno, podendo, o estímulo, ser mecânico, óptico, elétrico ou químico. Esta onda foi associada a variações da intensidade do espalhamento de luz no tecido. O autor conjecturou que a dinâmica do espalhamento de luz poderia estar associada a alterações na geometria do tecido e também a alterações eletrolíticas nos meios extra e intracelulares.

Em sua revisão de 1994, MARTINS-FERREIRA (1994) aponta os pesquisadores B. Deslisle Burns e B. Grafstein como os primeiros a sugerirem hipóteses sobre os mecanismos de propagação da DA, fato ocorrido em 1963. Os estudos destes pesquisadores baseavam-se em experimentos que indicavam o envolvimento do íon potássio na deflagração do fenômeno da onda de DA. A idéia era que uma brusca variação da concentração de potássio no meio extracelular causava uma despolarização em neurônios adjacentes que, por sua vez, liberavam mais potássio para o meio em atividade de propagação. Esta propagação poderia ser auto-sustentada de tal modo a caracterizar a depressão alastrante de Leão.

Já em 1966, MARTINS FERREIRA e OLIVEIRA CASTRO (1966) descrevem a seqüência do sinal óptico durante a onda de DA que é composto por quatro picos, sendo dois máximos e dois mínimos. Os pesquisadores definiram termos relativos a pontos característicos do sinal, identificaram a camada da retina onde a ocorrência do fenômeno era predominante, e sugeriram, com base em dados experimentais, que sua dinâmica era diretamente dependente da osmolaridade do meio.

No ano seguinte, VAN HARREVELD e KHATTAB (1967) registraram o transporte de eletrólitos e água entre os meios extra e intracelulares durante a passagem da onda de DA por meio da medição da impedância cortical. Salienta-se que esta variação de impedância, também concomitante à onda de DA, já havia sido constatada por Leão e

Martins-Ferreira nos idos de 1953. VAN HARREVELD e KHATTAB (1967) mostraram a ocorrência de uma alteração reversível do espaço extracelular durante a passagem da onda de DA. Já se começou, por esta ocasião, a observação dos efeitos da DA sobre a geometria do tecido.

OLIVEIRA CASTRO e MARTINS-FERREIRA (1970) estudaram a variação de volume e de espessura da retina de ave durante a onda de DA. Os autores mostraram que a variação da espessura e ondulações da superfície da retina eram concomitantes com a DA e observaram que as variações na geometria da retina estavam relacionadas à osmolaridade da solução de perfusão, independente da presença da onda de DA. Segundo estes autores, a movimentação de água entre os componentes do tecido seria responsável pelas variações no espalhamento de luz e pelas mudanças da geometria do tecido.

Preocupados em examinar os mecanismos de propagação da onda de DA, Martins-Ferreira e seu grupo, em 1974, desenvolveram uma técnica que elimina as possíveis interferências dos estímulos nas características da onda. A denominada onda de DA circulante, uma vez iniciada, pode ser mantida no tecido por várias horas com uma velocidade uniforme. O objetivo do desenvolvimento desta técnica era estudar os fatores responsáveis pela propagação da onda de DA.

Um grande detalhamento sobre as características elétricas, mecânicas e metabólicas que acompanham a DA foi registrado por DO CARMO e MARTINS-FERREIRA (1984). Com a utilização de eletrodos seletivos a ions, realizaram experimentos em retina de ave identificando: o perfil do potencial elétrico extracelular ao longo das camadas da retina e a variação no volume do espaço extracelular, além do registro da movimentação iônica na frente de onda de DA. Os pesquisadores identificaram a camada plexiforme interna como a camada onde a manifestação do fenômeno era máxima.

Um trabalho marcante sobre o sinal óptico na retina (OLIVEIRA CASTRO *et al.*, 1985) apontou uma forte dependência entre este sinal e o comprimento de onda da luz incidente. Foi registrado, através de retro-espalhamento, que o primeiro pico do sinal óptico

apresentava uma amplitude maior para a luz incidente na faixa do azul que na faixa do vermelho e que o segundo pico não apresentava distinção significativa para o comprimento de onda. Esses autores sugeriram que os dois picos máximos do sinal óptico fossem controlados por mecanismos diferentes durante a onda de DA. O primeiro pico estaria relacionado com forte movimentação iônica na frente de onda e o segundo pico estaria relacionado com o metabolismo do tecido. Este trabalho também sugeriu uma mudança do espalhamento de luz quando da variação da osmolaridade do meio extracelular onde a retina de ave era mantida.

LUX *et al.* (1986) apresentaram uma análise das variações iônicas no espaço extracelular durante a atividade epiléptica. Os autores mostraram a existência de correlação entre a movimentação iônica, provocando alterações na osmolaridade dos meios extra e intracelulares, e o fluxo de água com conseqüentes alterações da geometria do espaço extracelular.

A partir da década de 90, a associação de vídeo microscopia e registros eletrofisiológicos tornou-se uma ferramenta poderosa para o estudo de fenômenos, como a DA, em diversas escalas de tempo e espaço, permitindo o acompanhamento de ondas em diversas situações experimentais.

Tem sido mostrado que o estado funcional do tecido nervoso influencia suas propriedades ópticas possibilitando a monitoração da atividade cerebral através de medidas das mudanças na transmitância ou reflectância do tecido, ambas originadas das mudanças nas propriedades do espalhamento de luz (VILLRINGER e CHANCE, 1997).

O sinal óptico resultante dessas mudanças, denominado sinal óptico intrínseco, pode ser decomposto em dois componentes: um rápido e um lento. Para o caso do espalhamento de luz, com resposta temporal da ordem de poucos milisegundos, de acordo com STEPANOSKI *et al.* (1991), é possível correlacionar de forma linear o componente rápido do sinal óptico com a dinâmica do potencial de membrana de axônio em cultura. Evidências indicam que é possível deduzir, a partir do componente lento do sinal óptico, as

variações de volume do espaço extracelular, como descrito por HOLTHOFF e WITTE (1996, 1997, 1998). As variações de volume do espaço extracelular são caracterizadas pelas medidas do espalhamento de luz em uma fatia do tecido iluminado em campo escuro. Utilizando essa técnica de iluminação, é possível observar uma elevada correlação entre o componente lento do sinal óptico e a redução do espaço extracelular. A redução do espaço extracelular foi monitorada utilizando-se a técnica de injeção de ions não permeantes desenvolvida por NICHOLSON (1992). Recentemente, também utilizando o componente lento do sinal óptico, JOHNSON *et al.* (1999) postularam que, a partir da imagem calculada da razão de imagens de espalhamento, cada uma delas com diferentes ângulos de incidência do feixe de luz, é possível obter informações a respeito das mudanças morfológicas em organelas subcelulares, tais como inchaço mitocondrial, aumento de volume dendrítico ou fragmentação nuclear.

Esses desenvolvimentos e resultados justificam o aumento do uso do IOS na monitoração de tecidos excitáveis durante diferentes tipos de atividade neuronal prolongada, como após lesões (POLISCHUK e ANDREW, 1996, ANDREW *et al.*, 1996) e depressão alastrante de Leão, (OBEIDAT e ANDREW, 1998).

I.2 - OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de um protocolo experimental visando apoiar estudos que buscam a descrição dos mecanismos geradores do sinal óptico, permitindo relacioná-lo com a movimentação iônica e as alterações morfológicas que ocorrem na retina durante a passagem da onda de DA.

CAPÍTULO II – CONCEITOS BÁSICOS E A RETINA COMO MODELO EXPERIMENTAL

II.1 - A RETINA

Em razão da grande quantidade de informações envolvida em uma imagem, o olho é um sensor que necessita processar localmente seu sinal. A estrutura responsável por esse processamento é a retina, sendo um caso único de receptores e tecido neural intimamente conectados num nível periférico do sistema nervoso. Tal qual os tecidos corticais, a retina é estratificada e, nesse sentido, suas camadas são bem mais definidas que a estrutura neural do arcicórtex, o hipocampo, considerada a de estratificação melhor evidenciada. A figura II.1 destaca os principais componentes estruturais da retina, relevantes para o presente trabalho, dispostos em camadas. A luz, após atravessar o sistema de lentes do olho e o humor vítreo, penetra na retina e atravessa quase toda a sua espessura, de aproximadamente 300 μm , para então atingir a camada dos fotorreceptores. Do interior para o exterior do olho, as camadas da retina são assim denominadas: (1) camada ganglionar, (2) camada plexiforme interna, (3) camada nuclear interna, (4) camada plexiforme externa, (5) camada nuclear externa, (6) camada dos fotorreceptores. Interna à camada ganglionar, se encontra a camada de terminais sinápticos, principalmente de células gliais, denominada *endfeet*.

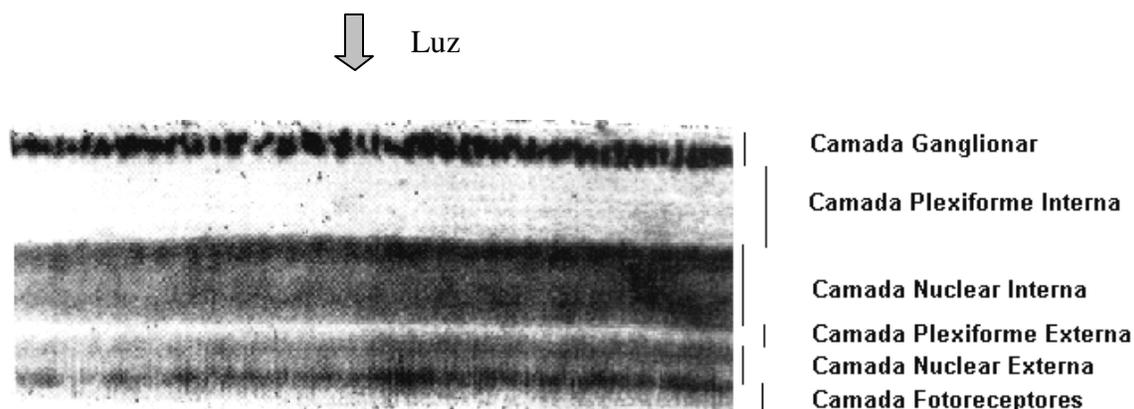


Fig. II.1 - Imagem digitalizada das camadas da retina de ave. À direita se encontra a denominação comum dessas camadas. (Modificada de LADEWIG *et al.*, 1998)

As principais camadas da retina podem ser agrupadas em quatro camadas celulares e duas camadas plexiformes. As camadas nuclear externa e dos fotoreceptores, as mais distais, são constituídas pelos corpos celulares das células receptoras. A camada nuclear interna é constituída pelos corpos celulares das células horizontais, bipolares e amácrinas, enquanto que os corpos celulares das células ganglionares são encontrados na camada celular mais proximal, ao longo da borda mais interna da retina. Nas retinas são encontrados elementos gliais, células de Müller, que se estendem verticalmente ao longo de toda a retina, tendo seus núcleos situados na camada nuclear interna.

Segundo DOWLING (1979), virtualmente, todas as sinapses que ocorrem na retina estão restritas às duas camadas plexiformes e, em cada uma dessas camadas sinápticas, os processos dos três tipos principais de células interagem. As células fotoreceptoras fornecem o sinal de entrada para a camada plexiforme externa, onde interagem, sinápticamente, com os dendritos das células bipolares e os processos das células horizontais. As células bipolares são os neurônios de saída da camada plexiforme externa. Todas as informações visuais passam da camada plexiforme externa para a interna através das células bipolares. As células horizontais, por outro lado, têm processos que se estendem ao longo da camada plexiforme externa e a maior parte de seus processos estão confinados a esta camada. Essas células transmitem horizontalmente os sinais das células receptoras para os dendritos das células bipolares.

As células bipolares são a entrada da camada plexiforme interna. Seus terminais sinápticos, no interior desta camada, fazem contato com os dendritos das células ganglionares e os processos das células amácrinas. Desta forma, esta camada é constituída por uma alta densidade de interfaces entre meios extra e intracelulares. As células ganglionares e seus axônios são a saída da camada plexiforme interna e, além disso, de toda a retina. As células amácrinas transmitem sinais em duas direções, diretamente das células bipolares para as células ganglionares ou horizontalmente entre os axônios das células bipolares, os dendritos das células ganglionares, e/ou outras células amácrinas. Os processos das células amácrinas estão restritos ao interior da camada plexiforme interna.

Há muito a Neurociência considera as unidades neuronais como os elementos fundamentais da fisiologia dos tecidos neuronais, porém, a partir da década de 60, esta visão mudou com a identificação do importante papel desempenhado pelas células gliais.

A retina de vertebrados é formada, embriologicamente, como uma bolsa exterior do cérebro, podendo ser considerada como uma amostra do tecido cerebral, havendo, contudo, alguns aspectos que a distinguem dos tecidos corticais. As células gliais da retina são um indicativo desta distinção (NEWMAN, 1989). Na maioria dos tecidos do sistema nervoso central, astrócitos e oligodendrócitos constituem a maioria das células gliais. Já na retina, a principal célula glial presente é a célula de Müller que se apresenta disposta radialmente e atravessa todas as camadas (Figura II.2). Cada célula possui uma árvore dendrítica extensa e complexa em relação a um eixo longitudinal passando pelo seu soma (NEWMAN, 1989, LADEWIG *et al.*, 1998). A figura II.2A mostra células de Müller típicas da retina de ave.

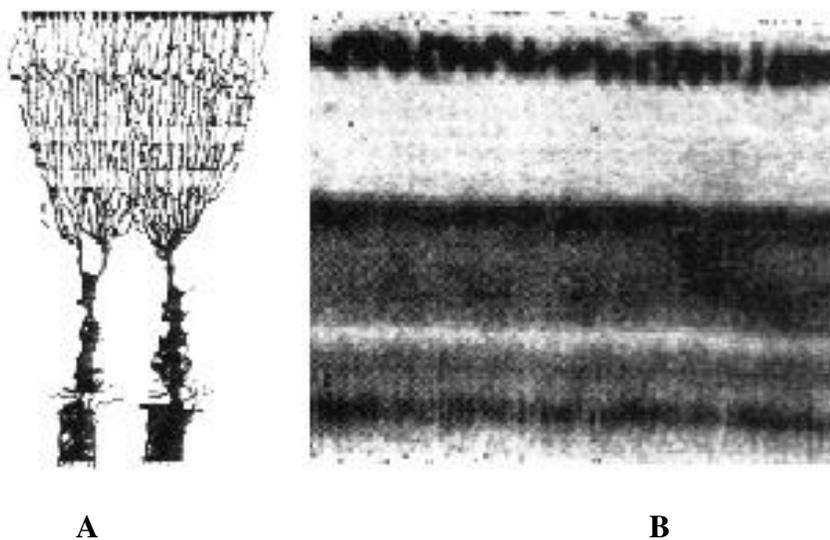


Fig. II.2 - **A** - Células de Müller da retina de ave. (Modificada de NEWMAN, 1989); **B** - Imagem digitalizada das camadas da retina de ave (Modificada de LADEWIG *et al.*, 1998).

As propriedades fisiológicas das membranas das células gliais foram estabelecidas em 1965 com os estudos de Stephen Kuffler. Este pesquisador demonstrou que a membrana de glia, tanto de vertebrados quanto de invertebrados, é seletivamente permeável ao íon

potássio (K^+) e não é excitável eletricamente. KUFFLER *et al.* (1966) e ORKAND *et al.* (1966) postularam que células gliais têm uma importante função na regulação da concentração extracelular do íon potássio, através do mecanismo conhecido como tamponamento espacial de K^+ (K^+ *spatial buffering*).

Esse mecanismo, segundo WALZ (2000), baseia-se na tendência das membranas de células vizinhas, em um sincício, apresentarem uma característica isopotencial. Dessa forma, se em uma região, a concentração extracelular de potássio $[K^+]_o$ é aumentada, o potencial de equilíbrio do íon fica mais positivo que o potencial de membrana. Como a membrana é altamente permeável a este íon, haverá um influxo passivo de K^+ . Para a configuração de um circuito fechado, a corrente de K^+ será distribuída para outras partes do sincício através de junções tipo *gap* (*gap junctions*). Em regiões mais afastadas daquela submetida ao aumento da concentração de K^+ , o potencial de equilíbrio desta espécie iônica é mais negativo que o potencial de membrana devido à tendência do sincício em permanecer isopotencial. Portanto, nestas regiões, haverá um efluxo passivo de K^+ . O potássio, então, é passivamente transportado de uma região extracelular com alta concentração para outra região extracelular mais distante com baixa concentração.

II.2 – A DEPRESSÃO ALASTRANTE E A RETINA

A DA não é um atributo exclusivo do córtex. A onda já foi detectada em várias estruturas neurais como bulbo olfatório, medula espinhal (STREIT *et al.*, 1995) e a retina. As justificativas para a utilização de retina, e particularmente a retina de ave, como modelo experimental para estudo do fenômeno da DA, *in vitro*, (MARTINS-FERREIRA, 1983) são: 1) a localização anatômica de seus elementos celulares possibilita isolar uma parte do sistema nervoso central com menos danos que qualquer outra região desse sistema; 2) sua organização laminar é comparável e, até mesmo, mais definida que aquelas de outras áreas do sistema nervoso central, apresentando camadas plexiformes bem delimitadas, com sinapses e pequenos processos de células gliais e neuronais; 3) devido à sua pequena espessura, pode ser vista como uma fatia natural do tecido nervoso; 4) devido à localização invertida de suas células receptoras, é relativamente transparente à luz visível; 5) como, em

particular, a retina de ave é desprovida de vasos sanguíneos, isso indica que, mesmo *in vivo*, sua integridade funcional deve ser garantida pela movimentação de fluidos em sua interface com o meio de perfusão; 6) em uma fatia isolada de retina de ave imersa em uma solução nutriente apropriada é possível provocar sucessivas ondas de DA por várias horas.

Na retina, a onda de DA é fundamentalmente idêntica àquela observada em córtex: a) variação de tensão lenta, negativa e reversível com amplitude e dinâmica temporal similares; b) aumento reversível da impedância elétrica do tecido; c) velocidade de propagação da mesma ordem de grandeza; d) existência de um período refratário na faixa de minutos; e) susceptibilidade à razão $[K^+]_o / [Mg^{2+}]_o$ e f) variação no volume do tecido durante a ocorrência do fenômeno (MARTINS-FERREIRA, 1983).

Por outro lado, a onda de DA na retina destaca-se daquela em córtex por estar acompanhada de um sinal óptico, que pode ser visto em binoculares de baixa ampliação ou até mesmo a olho nu. O fenômeno pode ser identificado visualmente na retina, como uma onda circular “leitosa” que se afasta do ponto de estímulo.

Martins-Ferreira e cols. determinaram uma composição química de uma solução salina que daria à retina maior susceptibilidade para a ocorrência do fenômeno e ainda permitiria, *in vitro*, a manutenção dessas condições por várias horas.

A figura II.3 apresenta uma seqüência de fotografias, em diferentes intervalos de tempo, que permite a visualização da propagação da onda de DA em retina de ave. A onda pode ser identificada pelo círculo esbranquiçado, que se expande para além de uma pequena região central onde foi estimulada.

Experimentos com a onda de DA, para registros de potencial extracelular, movimentações iônicas com eletrodos seletivos a ions, variações de geometria e do IOS, podem ser feitos tanto com a retina na calota ocular quanto com a retina (ou um fragmento dela) removida e separada de outras membranas da calota ocular.

As variações lentas do potencial extracelular têm as propriedades dos chamados campos potenciais (MARTINS-FERREIRA, 1983). Estas variações seriam gradientes de potencial causados por fluxos iônicos (correntes), através do espaço extracelular, associados à passagem da onda de DA. Os trabalhos de Nicholson com potenciais extracelulares (MARTINS-FERREIRA *et al.*, 2000) sugerem que estes potenciais são decorrentes de correntes passando através das células gliais que estão localmente despolarizadas pela maciça liberação de potássio durante a DA e que, as correntes, estariam relacionadas com o fenômeno do tamponamento espacial. Nicholson (MARTINS-FERREIRA *et al.*, 2000) sugere ainda que este mecanismo pode não ser o único responsável pelos potenciais extracelulares. Este pesquisador considera ainda a possibilidade do potencial extracelular negativo dever-se, parcialmente, a um potencial de Nernst desenvolvido diretamente através do espaço extracelular sem correntes circulantes. Esse potencial teria como origem a permeabilidade das células gliais, que é exclusiva para o íon potássio. Dessa forma, forma-se um tipo de "macro-membrana" (barreira) local entre a parte do tecido invadida pela DA e regiões mais distantes. Esta barreira seria criada, principalmente, pela redução do volume do espaço extracelular já observada durante a DA.

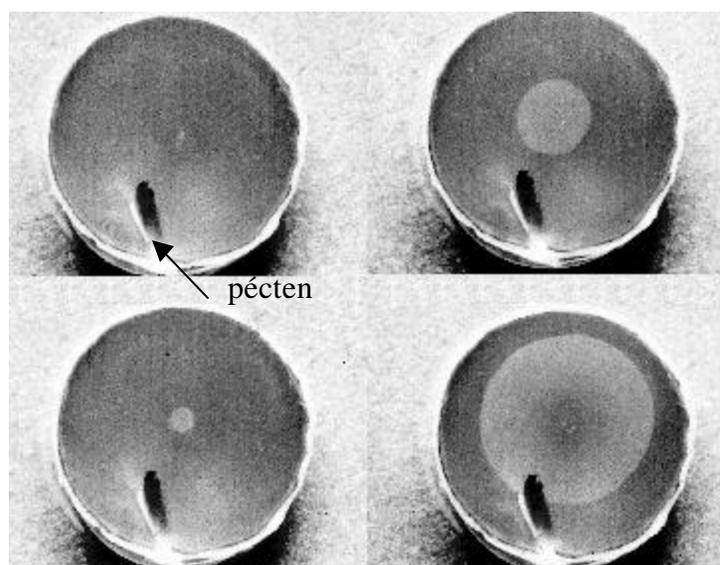


Fig. II.3 - Fotografias, em diferentes intervalos de tempo, da propagação da onda de depressão alaistrante acompanhada de um sinal óptico (área circular mais clara) em retina de ave na calota ocular imersa em solução de banho. No canto superior esquerdo, tem-se a fotografia do hemisfério inferior antes do estímulo; e, verticalmente, 17, 40, 100 s após estimulação mecânica na área correspondente ao centro da onda "leitosa". Pode-se observar o início e a recuperação da região onde a onda foi iniciada. (Modificada de MARTINS-FERREIRA *et al.*, 2000).

O potencial extracelular, em retina, é medido, em relação a uma referência na solução nutriente, inserindo-se um microeletrodo, preenchido com uma solução salina, dentro da camada de interesse. Pode-se utilizar soluções de NaCl, a própria solução nutriente, ou soluções de KCl. DO CARMO e MARTINS-FERREIRA (1984) identificaram o perfil do potencial extracelular ao longo de praticamente toda a espessura da retina de ave. Os autores utilizaram, em geral, solução de NaCl, na concentração de 150 mM, como solução na pipeta de medição. Para determinação do posicionamento espacial da ponta da pipeta, utilizaram marcadores injetados por micro iontoforese. Após o experimento, os autores determinavam o posicionamento da ponta da pipeta através de um corte histológico transversal na retina. A amplitude máxima negativa do gradiente de potencial ocorre na região central da camada plexiforme interna, ponto 3 na figura II.4. As formas de onda típicas dos potenciais estão também mostradas nesta figura. A fase negativa da onda de DA tem uma amplitude máxima de 20 a 25 mV. No entanto, na camada plexiforme externa obtém-se deslocamentos positivos de potencial, na faixa de 2-10 mV, ainda não totalmente explicados.

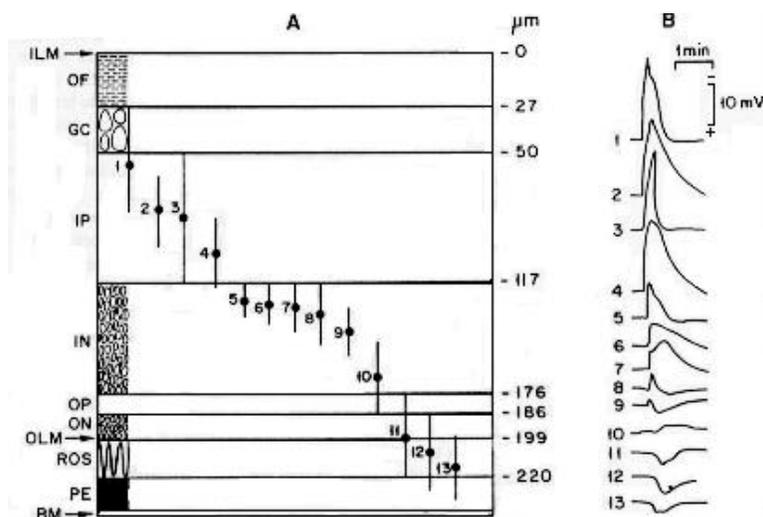


Fig. II.4 - Registros do perfil de potencial ao longo das camadas da retina. **A** - Diagrama esquemático da retina de ave mostrando a localização de 13 regiões de medida (linhas verticais indicam a dimensão radial de cada região). As camadas estão identificadas neste trabalho como: ILM, membrana limitante interna; OF, camadas de fibras ópticas; GC, camada de células ganglionares; IP \equiv IPL, camada plexiforme interna; IN, camada nuclear interna; OP, camada plexiforme externa; ON, camada nuclear externa; OLM, membrana limitante externa; ROS, segmentos receptores externos; PE, pigmentos epitélicos; BM, membrana de Bruch. A escala indica a espessura (μm) das camadas da retina, relativa a espessura total da retina compreendida entre a ILM e a borda externa do ROS no nível da calota polar. **B** - Potenciais na DA registrados nos pontos correspondentes indicados em A. Deflexões para cima da linha de base são negativas e para baixo positivas (Modificada de DO CARMO e MARTINS-FERREIRA, 1984)

As grandes movimentações iônicas, que ocorrem durante a onda de DA, podem ser monitoradas medindo-se as concentrações iônicas. Na região à frente da onda de DA, as concentrações dos ions Na^+ , Ca^{2+} e Cl^- diminuem, enquanto que a concentração do íon K^+ aumenta no espaço extracelular (DO CARMO e MARTINS-FERREIRA, 1984). O desenvolvimento de microeletrodos seletivos a íons possibilitou um grande avanço nesses estudos. Apesar das dificuldades inerentes, com respeito a seletividade e calibração, estes microeletrodos permitem a descrição das mudanças nas atividades iônicas no meio extracelular com uma resolução temporal bem melhor que aquela obtida por métodos químicos (e.g. fluorescência). A figura II.5 apresenta o comportamento dinâmico das concentrações dos ions K^+ , Na^+ , Cl^- e Ca^{2+} , durante uma onda de DA em retina de ave. DO CARMO e MARTINS-FERREIRA (1984) mostraram que a variação máxima da concentração de cada íon também ocorre na camada plexiforme interna.

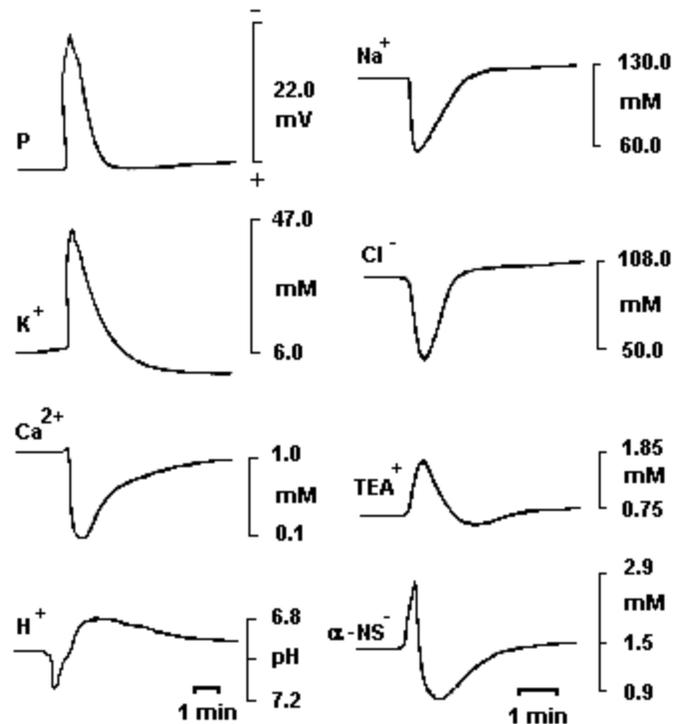


Fig. II.5 - Amostragem de potencial (P) e comportamento dinâmico dos ions K^+ , Ca^{2+} , Na^+ , Cl^- , TEA^+ (tetraetilamônio), H^+ e αNS^- (α -naftaleno-sulfonato) no meio extracelular durante DA, medidos na camada plexiforme interna de retina de ave. A escala de tempo à direita se aplica a todos os registros exceto para o pH que possui escala própria. (Modificada de: MARTINS-FERREIRA e DO CARMO, 1986).

DO CARMO e MARTINS-FERREIRA (1984) incluíram, em seus estudos, a análise da distribuição dos ions TEA^+ (tetraethylammonium) e $\alpha\text{-NS}^-$ (α -naphthalenesulfonate) em função de seus efeitos, no tecido, permitirem avaliar as mudanças no volume do espaço extracelular durante a reação de DA. Interpretaram que, quando em baixas concentrações e em equilíbrio com o meio, e, considerando ainda que eles não permeiam as membranas das células, as alterações em suas atividades indicavam o movimento de água do espaço extra para os intracelulares que, por sua vez, provocavam aumentos ou reduções nas dimensões do espaço extracelular do tecido.

A tabela II.1 resume as variações de concentrações iônicas no espaço extracelular, durante onda de DA, em retina de ave na temperatura de 30 °C. Pode-se observar que a maior variação percentual, em relação ao valor de base, é do íon cálcio (redução aproximada de 20 vezes) seguida pela do íon potássio (aumento aproximado de dez vezes). No entanto, em valores absolutos, a maior parte da variação da concentração total do meio extracelular se deve às variações nas concentrações dos ions sódio e cloreto.

II.3 – ESPALHAMENTO DE LUZ NA RETINA DURANTE A DA.

A variação temporal do espalhamento de luz que acompanha a DA é determinada pela medição da intensidade de luz em uma área da retina. O espalhamento de luz varia em intensidade, em uma região de observação, segundo uma seqüência regular. A morfologia típica da seqüência do espalhamento de luz na retina é apresentada na figura II.6.

Tabela II.1 - Variações das concentrações iônicas (mM) no meio extracelular durante DA na Retina de Ave. Os dados estão na forma de média $\pm \sigma$ (Desvio Padrão). Entre parênteses é apresentado o número de experimentos. Temperatura: 30 °C. (Modificada de: DO CARMO e MARTINS-FERREIRA, 1984)

| Íon | Valor basal | Valor máximo durante DA | | | |
|----------------------|-------------|---------------------------|------|---------------------------|------|
| | | Camada Plexiforme Interna | | Camada Plexiforme Externa | |
| K^+ | 6 | 49,10 \pm 9,03 | (9) | 13,800 \pm 2,07 | (8) |
| Ca^{2+} | 1 | 0,05 \pm 0,01 | (11) | 0,466 \pm 0,28 | (4) |
| Cl^- | 108 | 55,50 \pm 5,38 | (14) | 93,800 \pm 6,89 | (10) |
| Na^+ | 131 | 64,30 \pm 12,50 | (3) | 92,000 \pm 11,30 | (2) |
| TEA^+ | 0.75 | 2,02 \pm 0,27 | (8) | 1,020 \pm 0,06 | (3) |
| $\alpha\text{-NS}^-$ | 1.50 | 2,17 \pm 0,28 | (4) | 1,650 \pm 0,07 | (2) |

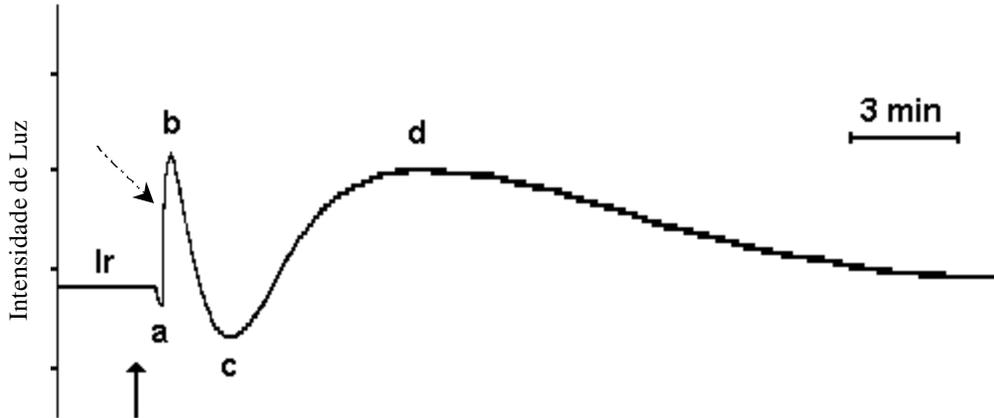


Fig. II.6 - Morfologia padrão da seqüência do espalhamento de luz na retina mantida em solução nutritiva. Ir é a intensidade do espalhamento de luz na ausência da depressão alastrante. O eixo das ordenadas está dividido em unidades arbitrárias e indica a intensidade de luz. A seta vertical indica o instante de aplicação do estímulo. A seta inclinada indica o instante da alteração na taxa de variação da intensidade de luz (Modificada de: MARTINS-FERREIRA e OLIVEIRA CASTRO, 1966).

A caracterização do sinal óptico tal qual apresentada na figura II.6 foi feita por MARTINS-FERREIRA e OLIVEIRA CASTRO (1966). A linha de base, Ir, é correspondente ao espalhamento de luz antes da onda de DA atingir a região de observação. Tipicamente, a evolução temporal do espalhamento de luz na retina apresenta dois pontos mínimos, (a e c), e dois pontos máximos, (b e d). Em relação ao início da seqüência da evolução temporal do espalhamento de luz, o ponto a é atingido em poucos segundos e, em alguns experimentos, não aparece. A intensidade do espalhamento do ponto a para o ponto b pode exibir uma taxa de variação uniforme, ou pode apresentar duas regiões distintas de crescimento. A primeira fase de crescimento é rápida, sucedida de uma segunda com taxa de crescimento menor, como indicado pela seta tracejada inclinada na figura II.6. O tempo para ocorrência do pico c é de 1,5 a 3 minutos, enquanto que o pico d ocorrerá de 3 a 8 minutos após o início da seqüência da evolução temporal. Após ocorrência do pico máximo d, a curva decai lentamente e volta para o ponto de equilíbrio Ir em cerca de 15 a 30 minutos. A seqüência de espalhamento de luz é independente da direção de propagação da onda de DA, e não muda apreciavelmente sua dinâmica por várias horas.

MARTINS-FERREIRA e OLIVEIRA CASTRO, 1966, relacionaram os valores absolutos das variações do espalhamento de luz, durante a DA, à intensidade da linha de

base Ir e concluíram que estes são diretamente proporcionais, dentro da faixa de intensidade da luz incidente que utilizaram. Isso indicou que o sinal óptico podia ser apresentado normalizado em relação à linha de base. A diferença na intensidade de luz entre o pico **b** e o pico **c** é da ordem de 35% da intensidade Ir. Baseado em evidências químicas e físicas, MARTINS-FERREIRA e OLIVEIRA CASTRO (1966) e MARTINS-FERREIRA (1983) concluem que os picos **b** e **d** possuem diferentes propriedades. Os autores afirmam que fatores metabólicos influenciam mais o pico **d** que o pico **b**. Por outro lado, o primeiro pico máximo está relacionado, no tempo e espaço, com a movimentação iônica que acompanha a DA. OLIVEIRA CASTRO *et al.* (1985) mostraram que o pico **b** tem maior dependência do comprimento de onda da luz incidente que o pico **d**. Os autores mostraram que a intensidade de luz retro-espalhada no pico **b** é maior para o comprimento de onda relativo à faixa do azul que na faixa do vermelho. A intensidade de luz retro-espalhada no pico **d**, não apresenta diferença significativa para os comprimentos de onda na faixa do vermelho e azul. O resumo dos resultados experimentais que sustentam essas afirmações estão reproduzidos na figura II.7. As curvas apresentadas nesta figura mostram que o pico **b** apresenta mais sensibilidade que aquela do pico **d** quando se varia o comprimento de onda da luz incidente.

II.3.1 - EFEITOS DA OSMOLARIDADE SOBRE O ESPALHAMENTO DE LUZ

MARTINS-FERREIRA e OLIVEIRA CASTRO (1966) indicaram a influência da variação da osmolaridade do meio extracelular no espalhamento de luz na retina. Os resultados experimentais indicaram que, na presença de um meio hipertônico, a retina se apresentava mais esbranquiçada o que significa baixa transmitância ou elevado retro-espalhamento. Por outro lado, na presença de um meio extracelular hipotônico, a retina se apresentava como um meio de elevada transmitância. Eles observaram a passagem da onda de DA e verificaram que a diferença entre os valores dos picos **b** e **c** do sinal óptico permanecia praticamente a mesma independente da osmolaridade do meio extracelular, apesar da alteração no retro-espalhamento indicada pela linha de base.

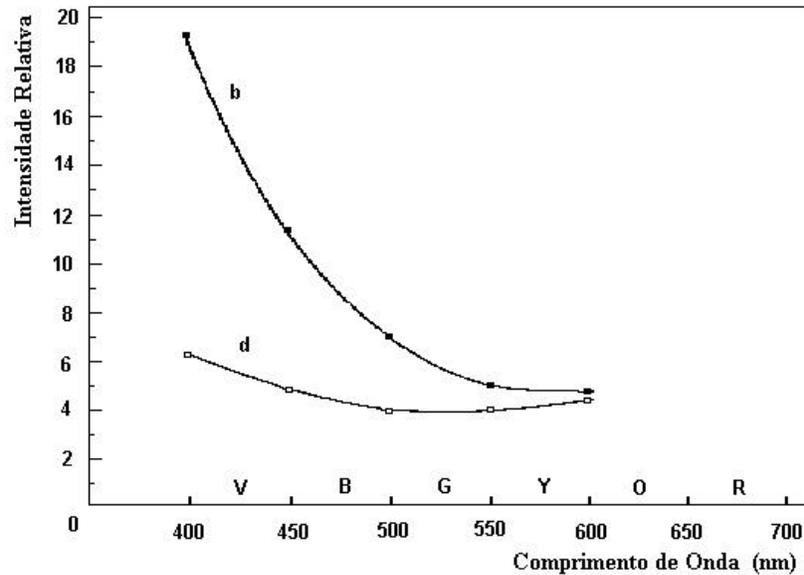


Fig. II.7 - Razão entre os picos máximos **b** (♦) e **d** (o) e o comprimento de onda da luz incidente. Cada ponto corresponde a uma média de 10 medidas. Onde, **V** - violeta; **B** - azul; **G** - verde; **Y** - amarelo; **O** - laranja; **R** - vermelho. (Modificado de: OLIVEIRA CASTRO *et al.*, 1985).

A figura II.8 mostra o gráfico dos resultados experimentais relativos à mudança na osmolaridade do meio extracelular através da variação de NaCl utilizado para a composição da solução nutriente de imersão da retina. Todos os efeitos da variação da osmolaridade foram reversíveis com o retorno para a solução nutriente normal. No mesmo trabalho, ainda intuíram que as proeminentes alterações ópticas da IPL estariam correlacionadas com suas características morfológicas. As evidências experimentais da movimentação de água dentro do tecido durante a onda de DA foram registradas em suas discussões, abordando trabalhos que postularam a existência dessas movimentações utilizando outras estruturas neurais.

OLIVEIRA CASTRO e MARTINS FERREIRA (1970) estudaram a variação da espessura da retina durante a passagem da onda de DA. Seus resultados experimentais mostraram que não há uma correlação ponto a ponto entre o sinal óptico da onda de DA e a curva de variação da espessura da retina. Os autores verificaram que a espessura da retina está inversamente relacionada com a osmolaridade do meio extracelular sem a presença da onda de DA. Se a osmolaridade aumenta a espessura diminui e vice-versa. Eles sugeriram que o fluxo de água, que é responsável por mudanças estruturais no tecido, e as variações nas concentrações dos eletrólitos poderiam estar substancialmente envolvidos com as variações no espalhamento de luz durante a passagem da onda de DA.

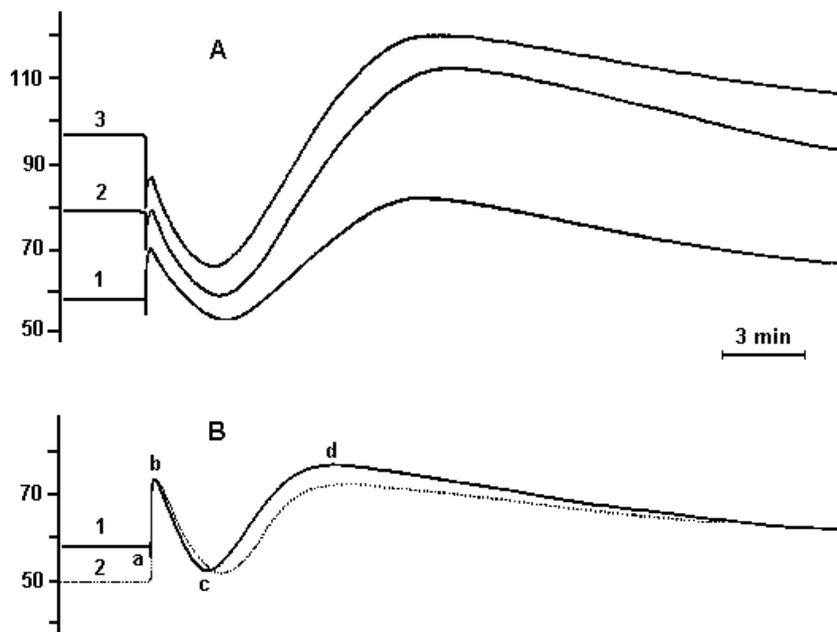


Fig. II.8 - Efeito da variação da osmolaridade da solução nutriente sobre o sinal óptico durante a passagem da onda de DA. **A**: registro 1 foi obtido com uma fatia de retina presa em uma base escura imersa em solução nutriente normal; registros 2 e 3 foram obtidos com aumento progressivo na concentração de NaCl. **B**: registro 1 com solução nutriente normal e registro 2 obtido com uma solução com menor concentração de NaCl. O eixo das ordenadas, em A e B, está dividido em unidades arbitrárias de intensidade de luz, onde o zero corresponde à intensidade registrada na base escura. (Modificada de MARTINS-FERREIRA e OLIVEIRA CASTRO, 1966).

Por outro lado, o fluxo de água entre os meios extra e intracelulares, durante a onda de DA, e a correspondente variação do espaço extracelular foram medidos por VAN HARREVELD e KHATAB (1967) em córtex de rato, utilizado como modelo experimental. Em 1986, Lux e cols. (LUX *et al.*, 1986) relataram seus resultados experimentais com respeito às variações iônicas e também ao tamanho do espaço extracelular, durante atividade epiléptica no hipocampo. Fica claro que durante estas atividades existe uma forte alteração do espaço extracelular.

II.4 - VELOCIDADE DE PROPAGAÇÃO DA ONDA DE DA NA RETINA

Uma forma de caracterizar a onda de DA, em retina de ave, é medir sua velocidade de propagação no tecido, concomitante com outras características, principalmente o potencial extracelular. LEÃO (1963) desenvolveu um procedimento para a medida da velocidade da onda em tecido cortical de coelho. Posicionavam-se dois eletrodos no tecido

cortical e provocava-se a onda de DA. A velocidade era medida em relação ao intervalo de tempo decorrido entre a passagem do potencial extracelular em cada um dos eletrodos. Em córtex de coelho, pôde-se mostrar que a redução da concentração de NaCl na solução nutriente aumentava a velocidade de propagação da onda de DA (LEÃO, 1963).

MARROCOS e MARTINS-FERREIRA (1990) salientaram a importância do estudo da velocidade de propagação da onda de DA, inferindo que ela pode fornecer informações sobre os mecanismos intrínsecos nela envolvidos. Por exemplo, estes autores relatam alterações na velocidade de propagação da onda quando o tecido é imerso em soluções com diferentes concentrações de NaCl. A relação entre a concentração de NaCl e a velocidade de propagação é inversa. Um decréscimo na concentração de NaCl, por exemplo, causa um aumento na velocidade de propagação. Os autores demonstraram que a velocidade de propagação da onda de DA é fortemente influenciada pela redução da concentração do íon cloreto na solução nutriente. Uma redução da concentração do íon cloreto causa um aumento na velocidade de propagação em uma relação proporcional ao logaritmo neperiano da concentração do íon cloreto. Por outro lado, a redução do íon sódio causa um efeito menor sobre esses mecanismos de propagação.

CAPÍTULO III - MATERIAIS E MÉTODOS

III.1 - ANIMAIS

Foram utilizadas retinas isoladas de ave (*Gallus gallus*), de 10 a 20 dias de idade, provenientes do biotério da FUNREI. Os animais foram alojados conforme convenções internacionais e não sofreram qualquer tipo de manipulação experimental até o dia de serem utilizados nos diversos experimentos realizados.

III.2 – SOLUÇÕES FISIOLÓGICAS

Foi utilizada a solução nutriente (Solução Normal, SN) com a seguinte composição (mM): NaCl 100, KCl 6, MgCl₂ 1, NaHCO₃ 30, NaH₂PO₄ 1, Tris 10, glicose 20 e CaCl₂ 1. O pH foi ajustado para 7,4 por adição de HCl.

As composições de outras soluções foram feitas com base na SN. As alterações específicas serão descritas no decorrer do texto.

III.3 – PREPARAÇÃO DA RETINA

O animal foi sacrificado por decapitação. Com uma microtesoura, as pálpebras foram removidas para exposição da região anterior do globo ocular. Por meio de uma tesoura de ponta longa e aguda, os músculos extrínsecos e o nervo óptico foram seccionados e o globo ocular foi removido da cabeça do animal. Considerando como pólos do globo ocular a região da córnea e o fundo do olho, uma secção, por meio de um bisturi, foi feita ao longo do equador. A retina pode ser identificada na região interna do fundo do olho ainda recoberta por *humor vitreo*. Removido o *humor vitreo*, retirado por meio de uma pinça, o hemisfério inferior foi colocado em uma placa de Petri com SN a 30 °C. Passados quinze minutos de repouso, a retina foi descolada do hemisfério inferior utilizando-se uma espátula de ponta arredondada, a fim de evitar lesões. Já completamente isolada do hemisfério inferior, a retina foi colocada sobre uma base de ágar, no fundo de uma cuba de

vidro, perfundida com soluções específicas de cada experimento e com temperatura controlada. Utilizada nestas condições, a retina pode ser submetida, por várias horas, aos diversos experimentos programados.

III.4 – MONTAGEM EXPERIMENTAL COM A RETINA E INDUÇÃO DA ONDA DE DA

Por sobre o ágar, conforme descrito no item anterior, foi colocado um cilindro de material preto (diâmetro de 2,5 mm), para evitar reflexão da luz incidente, e sobre este cilindro foi depositada a retina, fixada por meio de microalfinetes. A câmara de perfusão (cuba) foi colocada no estágio de um microscópio de baixa ampliação. Com esse procedimento, ajustando-se o foco, pôde-se visualizar as várias camadas da retina. A figura III.1A mostra um desenho da disposição da retina por sobre o cilindro preto preso a uma base de ágar. Esta disposição da retina foi utilizada para os experimentos com luz espalhada.

Uma variação da montagem experimental utilizada para determinação da secção em foco das camadas da retina foi implementada para o microscópio invertido (figura III.1B). A retina foi colocada sobre o cilindro preto de tal forma que a camada dos fotorreceptores contornasse quase todo o perímetro do cilindro. Assim, a luz branca incidente do microscópio invertido atravessava a secção em foco até atingir a objetiva.

A reação de DA foi iniciada por estímulo mecânico ou elétrico conforme descrito a seguir:

1. O estímulo mecânico foi feito com uma micropipeta de ponta fina com diâmetro em torno de 1,5 μm . O tecido foi perfurado com a micropipeta cujo movimento era controlado por um micromanipulador.

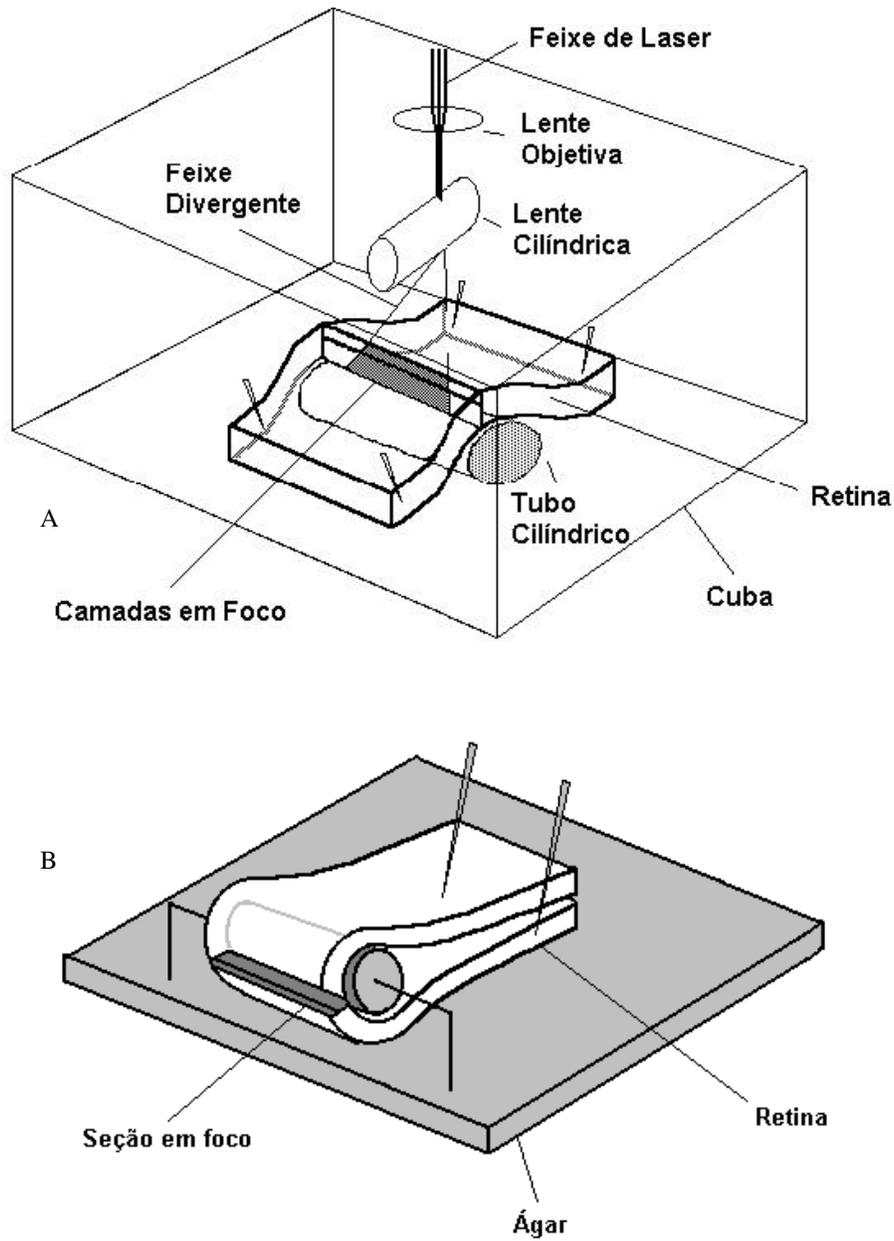


Fig. III.1 – Posicionamentos utilizados para experimentos com retina dentro da cuba. **A** - Posicionamento da retina sobre um cilindro preto para experimentos de luz refletida com laser; **B** - Posicionamento da retina sobre um cilindro preto para experimentos com luz transmitida.

2. O estímulo elétrico, utilizado na maioria dos experimentos, foi feito através de uma onda quadrada, simétrica, de amplitude, frequência e duração controladas. O estímulo elétrico foi gerado por um Sistema Auxiliar de Experimentos (SAE) por meio de um gerador de sinais implementado em computador (SILVA, 2000). Os valores ótimos de estímulo foram os de amplitude de 15 V, frequência de 10 Hz. As ondas de DA foram iniciadas com um tempo de estimulação da ordem de 5 a 12 segundos. O estímulo elétrico foi aplicado através de um par de eletrodos de prata-cloreto-de-prata (Ag-AgCl), inseridos em capilares justapostos (GC150F-10, 1 mm de diâmetro), preenchidos com SN. As extremidades dos capilares foram posicionadas em uma região, oposta àquela do eletrodo de medição, tangenciando a borda superior da retina, no mesmo plano do laser incidente. O espaçamento entre os capilares de estímulo e eletrodo de medição foi de aproximadamente 7 mm.

Estes procedimentos garantiram a deflagração da onda de DA sempre a partir de uma mesma região do tecido. A região escolhida foi aquela coincidente com o plano da secção em foco. Desta forma, garantiu-se que um plano tangente à frente de onda fosse perpendicular ao plano da secção em foco.

III.5 – DESCRIÇÃO DA INSTRUMENTAÇÃO (MONTAGEM EXPERIMENTAL)

Nos experimentos com utilização de fonte de *laser*, o tecido foi estudado através de uma binocular de baixa ampliação (Askania, GSZ 2T, Alemanha). Todos os dados foram armazenados em computador e/ou fita de vídeo para posterior processamento e análise, além de comparação com as correspondentes simulações. A figura III.2 apresenta um diagrama da montagem utilizada nos experimentos para iluminação com fonte de *laser*, com feixe perpendicular ao eixo da ocular e também com fonte de luz branca paralela ao eixo da ocular. A figura III.3 mostra um diagrama de outra versão de montagem experimental, mas para iluminação com luz branca (lâmpada de tungstênio), no plano que contém o eixo da ocular do microscópio. Nos experimentos de osmolaridade variável com luz branca transmitida, utilizou-se um microscópio invertido (Zeiss, Axiovert 100, Alemanha).

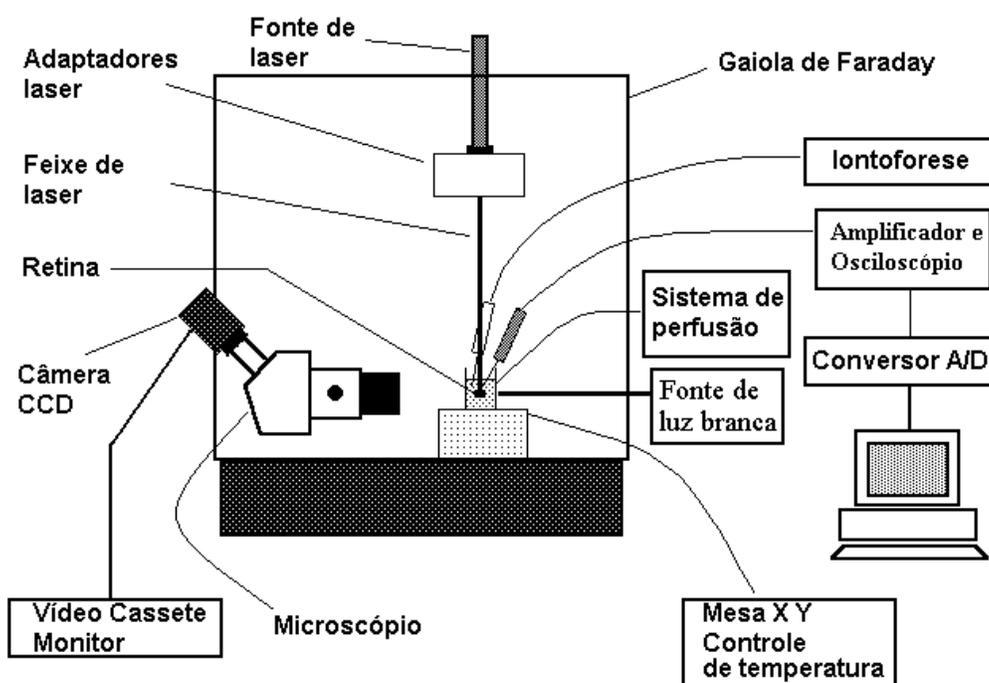


Fig. III.2 - Diagrama da montagem experimental para experimentos com retinas de ave iluminadas com fontes de laser e luz branca no mesmo eixo da ocular.

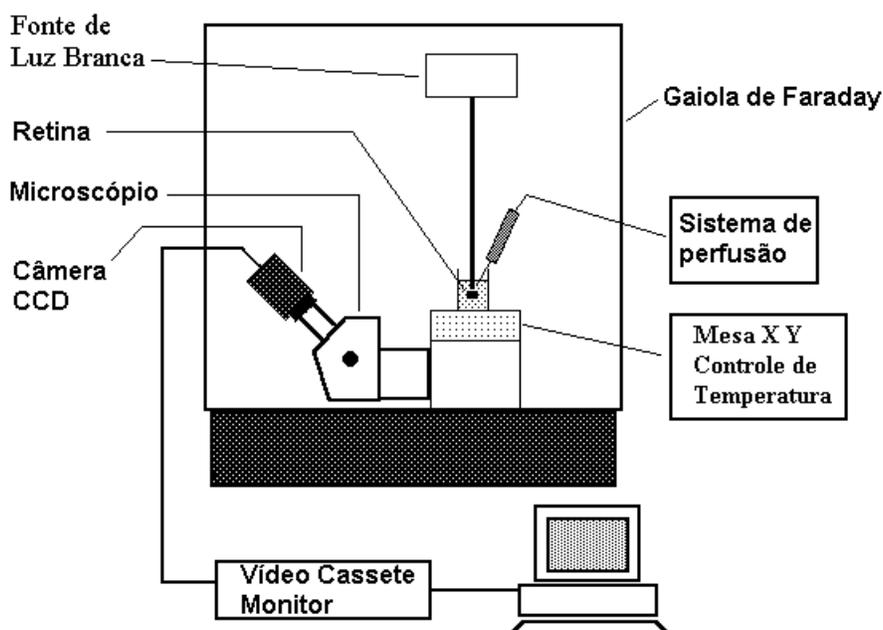


Fig. III.3 - Diagrama da montagem experimental para experimentos com retinas de ave iluminadas com fonte de luz branca e utilização do microscópio invertido.

Fontes de Laser

As fontes de *laser* utilizadas foram: uma de He-Ne, 2 mW (Xerox, 05-LHR-551, Estados Unidos) com comprimento de onda na faixa do vermelho (em torno de 675 nm) e outra de He-Ne, 5 mW (Coherent, 31-2772-000, Estados Unidos) com o comprimento de onda na faixa do verde (em torno de 525 nm). Os tubos das fontes de *laser* foram colocados em um estágio do microscópio no lugar das oculares através de um adaptador. Os feixes de *laser* incidiram, simultaneamente ou não, no eixo óptico de uma lente objetiva 5x/0,12/∞ (Zeiss, Zeiss Achrostigmat, Alemanha). Os feixes convergentes incidiram na superfície de uma lente cilíndrica de 6 mm de diâmetro resultando em feixes divergentes, restritos a um pequeno setor angular, superpostos, como detalhado na figura III.1A. Desta forma, iluminou-se um plano perpendicular às camadas da retina. A intensidade dos feixes pôde ser controlada mediante a utilização de filtros ópticos para redução da intensidade luminosa.

Conversor A/D

Foi utilizado um conversor A/D (Axon Instruments, Digidata 1200, Estados Unidos).

Binocular

O espalhamento de luz que aparece nas camadas da retina foi detectado por uma binocular, ao qual estava acoplada uma câmera CCD. A montagem do microscópio foi tal que sua objetiva apresentava um ângulo de 180° em relação à mesa XY. Dessa forma, pôde-se ter a secção transversal da retina em foco, o que permitiu a captação da luz espalhada vinda da iluminação com laser em um plano perpendicular ao eixo da objetiva.

Microscópio Invertido

A luz transmitida pelas camadas da retina foi detectada por um microscópio invertido, ao qual estava acoplada uma câmera CCD. A estrutura do microscópio foi tal que o eixo de sua objetiva foi coincidente com o eixo da fonte de luz branca e perpendicular ao plano da mesa XY. Desta forma, uma secção transversal das camadas da retina pôde ser visualizada, apresentada na figura III.1B, permitindo a captação da luz transmitida através da câmera CCD.

Câmera CCD

É uma câmera digital de alta qualidade (KOCOM Ltda., KCC310ND, Japão), com saída em VHS, com uma resolução de 450 linhas horizontais para TV e acoplamento direto aos microscópios. A luz espalhada (ou transmitida) pelas camadas da retina foi detectada por esta câmera e o sinal resultante era enviado a um vídeo cassete, como mostrado nas figuras III.2 e III.3.

Vídeo Cassete

Os sinais ópticos vindos da câmera CCD foram gravados em vídeo cassete (Zenith, VR4236HF, Rio de Janeiro) e posteriormente digitalizados em um *software* específico. O controle remoto deste vídeo possui uma tecla de controle manual da velocidade de avanço ou retrocesso da fita. Esse recurso foi muito útil para a digitalização das imagens gravadas permitindo uma taxa de amostragem de até 30 quadros por segundo. Em geral, as gravações foram feitas no sistema NTSC e as imagens extraídas em RGB, com uma resolução de 1,5 μm por *pixel* e com amostragem temporal de 1 quadro por segundo.

Eletrodos e Registro de potencial

O registro do potencial DC, resultante da propagação da onda de DA, foi feito através de um eletrodo preparado com pipetas de vidro (Clark Electromedical Instruments, GC150F-10). Para o registro do potencial utilizou-se uma micropipeta com ponta de 1,5 μm preenchida com solução de KCl (1 M). Os eletrodos apresentaram uma resistência de 20-40 $\text{M}\Omega$, como descrito por PURVES (1991).

A medição do potencial foi feita ligando-se um eletrodo de Ag-AgCl ao terminal de entrada do amplificador cuja saída foi ligada a uma interface AD e a um microcomputador. O *software* SAE (SILVA, 2000) foi usado para aquisição e análise de dados. Esse *software* permite um controle de ganho que torna o sinal amostrado idêntico ao sinal real antes da amplificação.

Amplificador

O sinal elétrico, vindo do microeletrodo, foi alimentado a um amplificador diferencial, com ganho ajustado em 200 (Tektronix, AM502, Estados Unidos) com ajuste no filtro passa-baixas (< 30 kHz) e saída máxima de ± 5 V. O sinal do amplificador foi então amostrado, a 50 Hz, utilizando-se o sistema SAE. As filtragens, quando necessárias, foram feitas *off-line*, utilizando-se o *software* Matlab ver. 5.3.

Computadores

Utilizou-se um microcomputador Pentium (233 MHz), compatível com IBM, para aquisição do sinal elétrico. O *software* Matlab ver. 5.3 foi utilizado para análise dos sinais óptico e elétrico. Em função do tamanho dos arquivos e do tempo de processamento, utilizou-se estações de trabalho (SUN microsystems, Ultra-10, Estados Unidos), para análise dos sinais óptico e elétrico processados com o *software* Matlab ver 5.0.

Estirador de Pipetas

Utilizou-se um estirador de pipetas universal (Zeitz-Instruments, DMZ-Universal Puller, Alemanha), particularmente os programas P03, para pipetas de injeção, e o programa P09, para pipetas de patch-clamp. Os programas P03 e P09 são programas pré-gravados pelo fabricante.

III.6 – PROCEDIMENTO PARA PERFUSÃO DE SOLUÇÃO NUTRIENTE NOS EXPERIMENTOS DE MEDIÇÕES DA ONDA DE DEPRESSÃO ALAISTRANTE COM LASER

Nos experimentos com luz espalhada foi utilizado um sistema de perfusão manual, no qual a SN foi pré-aquecida a 33 °C em um copo graduado de vidro de 250 ml. A temperatura da cuba, monitorada por um termômetro digital, foi controlada por um sistema de aquecimento utilizando-se um elemento *peltier*. A temperatura da solução dentro da cuba foi ajustada em 30 ± 1 °C.

A perfusão da solução salina foi feita por gravidade, e a taxa de perfusão foi controlada por um parafuso de pressão. O volume da cuba utilizada nesses experimentos foi de 5 ml e a taxa de perfusão utilizada de aproximadamente 1 ml/min.

III.7 – PROCEDIMENTO PARA PERFUSÃO DE SOLUÇÃO NUTRIENTE NOS EXPERIMENTOS DE MEDIÇÃO DE TRANSMITÂNCIA E ESPALHAMENTO DE LUZ COM DIFERENTES OSMOLARIDADES

Nos experimentos com luz transmitida e espalhada foi utilizado um sistema de perfusão manual, onde em dois equipos de 150 ml foram colocadas soluções nutrientes com concentrações de NaCl diferentes daquela da SN. Em um equipo foi colocada uma solução nutriente com concentração de NaCl de 60 mM e, em outro, uma solução com concentração de NaCl de 140 mM. Esta variação de $\pm 40\%$ em torno do valor normal (100 mM) foi baseada na faixa de variação descrita na literatura (MARTINS-FERREIRA e OLIVEIRA CASTRO, 1966 e DO CARMO e MARTINS-FERREIRA, 1984). As soluções nutrientes foram mantidas em temperatura ambiente (24 ± 1 °C). As perfusões das soluções salinas foram feitas por gravidade, e a taxa de perfusão foi controlada por parafuso de pressão. A taxa de perfusão utilizada era de aproximadamente 2,5 ml/min. Com este procedimento pôde-se estudar os efeitos de uma variação contínua da osmolaridade, desde uma situação hipotônica até a condição hipertônica, e sua reversibilidade no espalhamento de luz na retina.

A retina foi fixada na base de ágar em uma placa de Petri com SN. No microscópio invertido, a retina foi colocada em outra placa de Petri, disposição da figura III.1B, com a solução nutriente com 60 mM de NaCl. Imediatamente, iniciou-se a perfusão com a solução com NaCl em 140 mM de tal modo que em um tempo decorrido de 18 minutos, o volume da placa de Petri fosse completamente trocado. A perfusão hipertônica foi interrompida e aguardou-se 120 minutos para que a pressão osmótica pudesse equilibrar-se com o tecido. Após esse período, fez-se novamente a perfusão com a solução com 60 mM de NaCl, de tal modo que, em 18 minutos, o volume da placa de Petri fosse trocado para a nova solução.

III.7.1 - ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO EXTRACELULAR DE NaCl DURANTE A PERFUSÃO

Os resultados da intensidade luminosa foram apresentados em função da concentração de NaCl da solução dentro da placa de Petri. Para a estimativa desta

concentração de NaCl, em função do tempo, utilizou-se a equação de primeira ordem dada abaixo.

$$[\text{NaCl}]_o(t + \Delta t) = [\text{NaCl}]_o(t_o) \pm K e^{-\frac{(t-t_o)}{\tau}} \quad \text{III.1}$$

O sinal negativo foi utilizado para perfusão com solução hipertônica e o sinal positivo para a perfusão com solução hipotônica. As variáveis e constantes desta equação são identificadas por:

τ - constante de tempo ($= V / (f V_g)$).

t_o - instante inicial da perfusão [s];

$[\text{NaCl}]_o(t_o)$ - concentração inicial de NaCl, dentro da cuba, em M. Utiliza-se 0,14, como valor inicial, para perfusão com solução hipertônica e 0,06 para perfusão com solução hipotônica;

$[\text{NaCl}]_o(t + \Delta t)$ - concentração de NaCl, dentro da cuba, no instante $(t + \Delta t)$;

V - volume total da placa de Petri: ($\cong 9$ ml);

V_g - volume de uma gota de saída na perfusão ($\cong 0,0141$ ml);

f - frequência da taxa de perfusão ($\cong 3$ gotas/s);

t - tempo [s];

Δt - intervalo de tempo;

K - constante do componente transitório da equação: ($= 0.08$);

III.8 - PROCEDIMENTOS COMPUTACIONAIS

Os procedimentos para análise da evolução da onda de DA na retina foram constituídos dos seguintes passos (conceitos básicos estão no Apêndice I):

- 1) O registro gravado em vídeo cassete foi digitalizado com o *software* de aquisição Videdit® 1.1 (Microsoft), com taxa de amostragem máxima de 30 quadros por segundo. Este *software* transforma as imagens de vídeo em um arquivo de animação no

formato ***.AVI** (sufixo utilizado para vídeos digitalizados). A taxa de amostragem da animação foi estabelecida em função do formato dos quadros desejados, limitada pela velocidade de processamento do computador. No formato RGB 24 *bits* (*Red*, *Green* e *Blue*), a taxa de amostragem máxima automática foi de 2 quadros por segundo. Uma taxa maior, causa descontinuidade na seqüência de amostragem de cada quadro. Um microcomputador mais rápido permitiria uma amostragem maior do sinal óptico.

- 2) o *software* Videdit® 1.1 (Microsoft) também foi utilizado para extração dos quadros do arquivo de animação para o formato ***.DIB**. Os quadros de interesse foram identificados e extraídos da animação digitalizada.
- 3) um segundo *software*, chamado Gwspro (Graphic Workshop™ Professional 2.0a, Alchemy Mindworks), foi utilizado para converter os quadros extraídos no formato ***.DIB** em outros do formato ***.JPG**, cujo espaço ocupado em disco é muito inferior àquele correspondente aos arquivos ***.DIB**;
- 4) Utilizou-se o *software* PhotoEditor® 3.0 (Microsoft) para definição das linhas correspondentes da janela de observação do sinal óptico no tecido e para a localização da ponta da pipeta dentro da retina, a partir de um quadro de referência. Um exemplo deste quadro de referência está apresentado na figura III.4, onde pode-se identificar a faixa de colunas onde se encontra a posição mais provável da ponta da pipeta de medição (indicada por uma seta) e as linhas correspondentes à camada da IPL (indicadas por uma barra vertical). O *software* Matlab, ver. 5.3, foi utilizado, em microcomputador, para a programação das rotinas de saída de dados gráficos e processamento de sinais. As rotinas implementadas permitiram a visualização gráfica da evolução temporal e espacial da onda de DA.

III.8.1 – PROCESSAMENTO DE IMAGEM

No estudo da onda de DA, o uso da técnica proposta permitiu o registro de uma seqüência de imagens associadas a cada evento. O uso de técnicas de processamento de

imagens permitiu a determinação da velocidade da frente de onda e a Evolução Temporal e Espacial do Espalhamento de Luz (ETEL) nas camadas da retina. A longa duração do IOS para um evento completo de DA (em torno de 15 min) justificou a construção da ETEL, que é uma imagem que resume a informação do espalhamento de luz nas camadas durante um evento de DA.

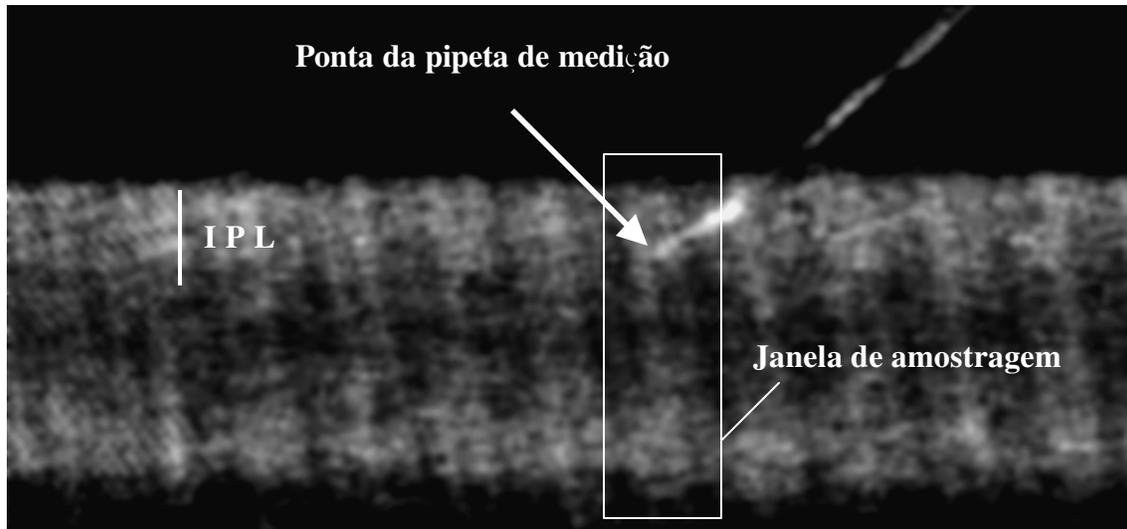


Fig. III.4 - Imagem digitalizada submetida a um filtro passa altas e ajustes de brilho e contraste para salientar a identificação do posicionamento da ponta da pipeta dentro da IPL e posicionamento da janela de amostragem, de N linhas e M colunas, para construção da ETEL.

Formato das Imagens

A matriz representativa de uma imagem em RGB (24 bits) contém 3 planos relativos às cores primárias Vermelho (R), Verde (G) e Azul (B). O primeiro plano corresponde à cor vermelha, o segundo plano à verde e um terceiro plano à azul. Para se determinar a intensidade de luz de um determinado *pixel*, a partir do formato RGB, deve-se, segundo GONZALEZ e WOODS (1993), utilizar uma matriz de transformação linear para o sistema HSI (Hue, Saturation e Intensity). A matriz de transformação é uma matriz diagonal cujos elementos têm valores iguais a $1/3$. Desta forma, a relação abaixo fornece a intensidade de luz total de um *pixel*, de posição (i, j) , a partir da intensidade de luz de cada plano do sistema RGB (GONZALEZ e WOODS, 1993).

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

onde,

I é a intensidade de luz total de cada *pixel*;

I_R , I_G e I_B são, respectivamente, as intensidades de luz correspondentes aos planos vermelho, verde e azul.

III.8.2 - ESTIMATIVA DA VELOCIDADE DA FRENTE DE ONDA

A velocidade v da frente de onda de DA pode ser estimada construindo-se o Perfil da Frente de onda no Tempo (PFT). O PFT foi construído dispondo-se, verticalmente, janelas retangulares da frente de onda de quadros consecutivos. Como as janelas retangulares possuíam o mesmo número de linhas, então o eixo vertical é uma escala linear do tempo. O eixo horizontal foi relacionado com a evolução espacial da frente de onda de DA. Com esta configuração, e conhecendo-se a resolução espacial da imagem, foi possível estimar a velocidade da frente de onda pela inclinação dada pelo ângulo θ (figura III.5).

III.8.3 - CONSTRUÇÃO DA ETEL

Um programa, desenvolvido em Matlab, foi utilizado para, a partir de uma janela de amostragem, compor uma imagem correspondente à ETEL da onda de DA. Essa janela foi determinada por uma matriz de N colunas por M linhas. O número M de linhas define a região de interesse dos quadros sucessivos extraídos do vídeo digitalizado. Para cada quadro, um vetor coluna resultante, de M linhas, foi obtido como o valor médio da intensidade de luz das N colunas da janela de amostragem. Cada vetor coluna foi justaposto ao vetor coluna do quadro anterior formando uma imagem que representa a ETEL da onda de DA.

A frente de onda, durante o intervalo de tempo entre dois quadros sucessivos digitalizados, avança sobre n colunas. O valor de n é dependente da velocidade de

propagação v , em *pixels/s*, e da taxa de amostragem s , em quadros/s. Para que não ocorresse superposição de informação da intensidade de luz entre dois quadros sucessivos, a determinação do número de colunas N da janela de amostragem, definida pela equação III.3, foi determinada como sendo um número ímpar inferior àquele obtido desta equação. A coluna central da janela de amostragem é coincidente com a posição mais provável da ponta do eletrodo, como exemplificado pela janela mostrada na figura III.4.

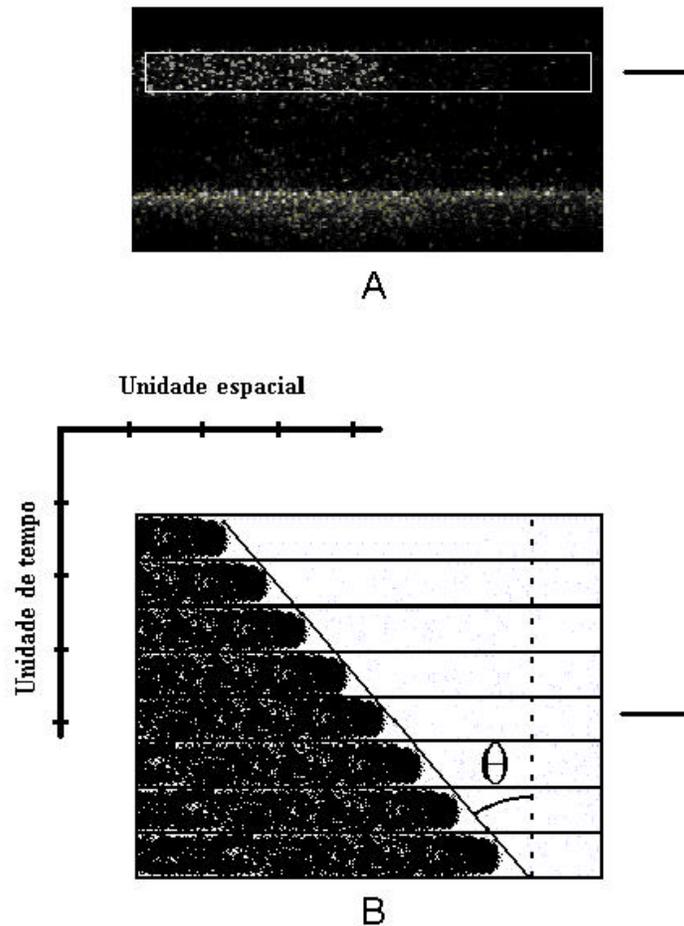


Fig. III.5 - Diagrama do procedimento utilizado para determinação da velocidade da frente de onda. **A**- Um quadro onde a frente de onda é capturada em um instante de tempo t_i com uma janela retangular correspondente à IPL. **B**, os retângulos correspondentes à IPL são posicionados em seqüência no tempo, partindo do topo. A velocidade da frente de onda é correspondente ao cálculo da tangente do ângulo θ .

$$n = \frac{v}{s}$$

III.3

Para a determinação do número de colunas relativas à ponta do eletrodo utilizou-se o seguinte procedimento:

Para cada experimento, após o registro do potencial e do sinal óptico, o eletrodo foi recuado de seu ponto de medida. A retina foi, então, removida do campo em foco, quando o eletrodo pôde ser recolocado na sua posição original, de acordo com a escala do micromanipulador. A imagem da ponta do eletrodo foi registrada através da câmera CCD. Para reduzir o erro aleatório de reposicionamento, esse procedimento foi repetido, pelo menos, vinte vezes. Após a determinação da coluna média e respectivo desvio padrão, estimou-se a posição da ponta do eletrodo utilizando-se um intervalo de confiança para a média. A faixa de *pixels* foi calculada pela seguinte equação padronizada:

$$N_{\text{Eletrodo}} = 2 Z_{\alpha/2} \frac{\sigma}{\sqrt{n}},$$

III.4

onde N_{Eletrodo} = número de colunas da provável posição da extremidade do eletrodo de medição de potencial extracelular; $Z_{\alpha/2}$ = variável padronizada; σ = desvio-padrão das amostras em colunas; n = número de amostras.

III.8.4 - SEQUÊNCIA DO SINAL ÓPTICO EM FUNÇÃO DO TEMPO

Um programa, desenvolvido em Matlab, foi utilizado para, a partir da imagem da ETEL da onda de DA, representar a seqüência do espalhamento de luz, em função do tempo, em um sistema de eixos cartesianos. O procedimento utilizado foi definir uma janela de amostragem, correspondente à camada de interesse, por uma matriz de X colunas por Y linhas. O número Y de linhas definiu a camada de interesse e X o número de colunas total da ETEL convertidas para a unidade de tempo pela taxa de amostragem. Um vetor linha resultante, de X colunas, foi obtido como o valor médio da intensidade de luz das Y

linhas da janela de amostragem. O vetor linha resultante, para a determinada camada, em um sistema de eixos cartesianos formou a seqüência temporal do espalhamento de luz.

III.8.5 - RAZÃO ENTRE OS PICOS MÁXIMOS DO SINAL ÓPTICO INTRÍNSECO

Para comprovar os resultados de OLIVEIRA CASTRO *et al.* (1985) quanto à dependência do primeiro pico do sinal óptico com o comprimento de onda da luz incidente, foram determinadas as ETEL, de cada onda de DA, para o conjunto de experimentos com *laser* vermelho e aqueles relativos ao *laser* verde. A partir da seqüência temporal do espalhamento de luz de cada onda de DA, extraíram-se os valores dos picos **b** e **d** e fez-se a razão entre eles. Desta forma, evitou-se o problema da equalização da intensidade dos feixes incidentes no tecido e apresentou-se um valor relativo para a razão entre os picos **b** e **d**, mostrando-se a influência do comprimento de onda sobre o espalhamento de luz.

CAPÍTULO IV - RESULTADOS EXPERIMENTAIS

IV.1 - ESTUDOS DA ONDA DE DA COM *LASER*

IV.1.1 - ESPALHAMENTO DE LUZ NAS CAMADAS DA RETINA

Alterações no espalhamento de luz nas camadas da retina durante a passagem da onda de DA foram registradas pela utilização da técnica de construção da ETEL. Na figura IV.1, apresenta-se uma imagem onde a frente de onda pode ser identificada na camada plexiforme interna. A disposição da retina, nessa imagem, é correspondente àquela mostrada na figura II.1.

A imagem digitalizada na figura IV.1 mostra a frente de onda de um experimento cuja velocidade é de 56,4 pixels/s. Esta velocidade foi obtida utilizando-se o procedimento de determinação de velocidade. Baseado nesta velocidade e na taxa de amostragem temporal das imagens igual a 1 quadro por segundo, obteve-se o número n (equação III.3) de colunas seqüenciais, sem superposição espacial de informações, de uma janela de amostragem de 56 colunas. O número de colunas N da janela de amostragem utilizado para a composição da ETEL foi de 55 colunas e o número de linhas igual a 160. Após a determinação do posicionamento espacial da ponta do eletrodo, descrita no item III.8.3, definiu-se a posição da janela de amostragem como mostrado na figura III.4. A evolução temporal e espacial pôde então ser determinada a partir de uma área retangular de 55×160 pixels, onde cada pixel corresponde a $1,5 \mu\text{m}$. Esta janela foi aplicada a uma seqüência de imagens digitalizadas, durante uma onda de DA, e a ETEL resultante está apresentada na figura IV.2.

A literatura descreve que a seqüência do espalhamento de luz ocorre principalmente, ou quase exclusivamente, na camada plexiforme interna da retina (OLIVEIRA CASTRO *et al.*, 1985, MARTINS-FERREIRA e OLIVEIRA CASTRO, 1966). A figura IV.2 mostra uma evolução ao longo de todas as camadas da retina. Pode-se observar que praticamente todo o sinal óptico se encontra concentrado ao longo da camada plexiforme interna. Nesta figura, o espalhamento de luz pronunciado entre as linhas 30 e 70 corresponde à IPL.

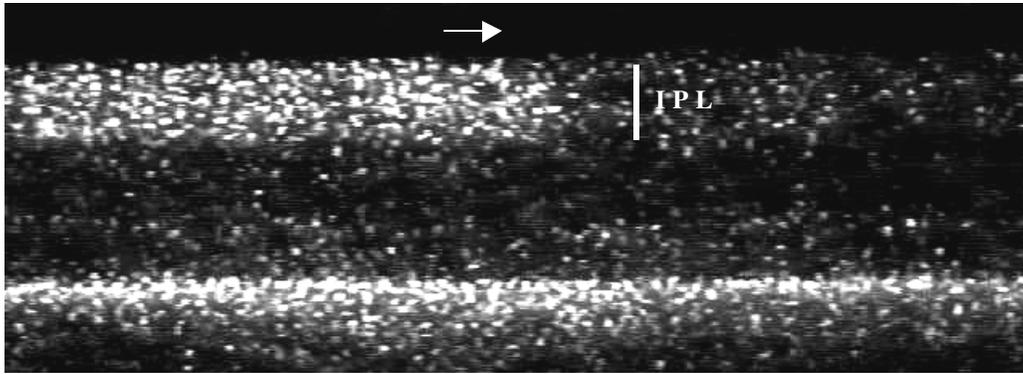


Fig. IV.1 - Frente de onda da onda de DA passando da esquerda para a direita (seta). O aumento do espalhamento de luz na IPL, em comparação com as outras camadas pode ser claramente identificado. Esta imagem possui a resolução (234×640) pixels.

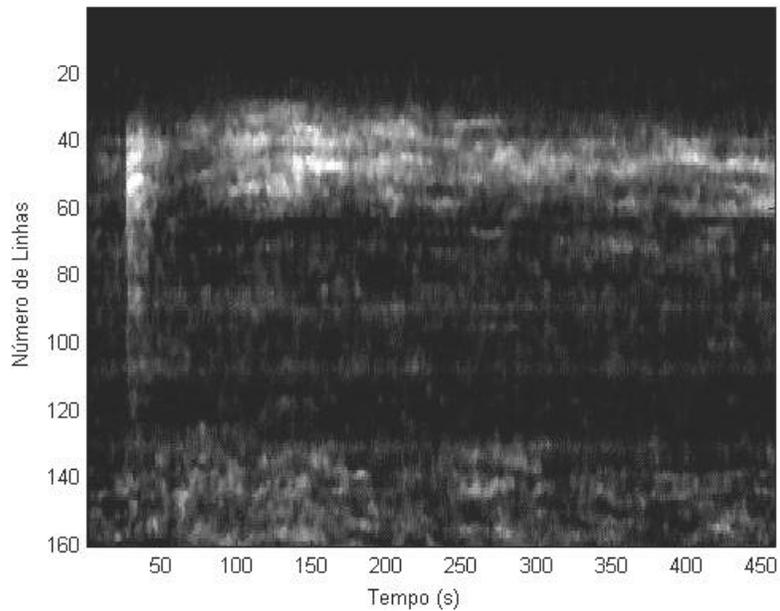


Fig. IV.2 - Imagem do espalhamento de luz nas camadas da retina representando a evolução temporal e espacial da onda de DA provocada por estímulo mecânico.

Considerando-se apenas a região relativa à camada plexiforme interna, pode-se observar, em eixos cartesianos XY, a variação temporal da luz ortogonalmente espalhada, durante a passagem da onda de DA. A reconstrução da intensidade do espalhamento em função do tempo pôde ser feita, a partir da ETEL mostrada na figura IV.2, pela média das linhas correspondentes à camada desejada. A intensidade do sinal óptico correspondente à IPL está apresentada na parte inferior da figura IV.3A. Simultaneamente, o deslocamento do potencial extracelular DC é apresentado na parte superior da figura IV.3A. Pode-se

observar que a forma de onda obtida é similar àquela típica descrita na literatura para luz retro-espalhada na retina por MARTINS-FERREIRA e OLIVEIRA CASTRO (1966). A figura IV.3B mostra três quadros digitalizados correspondentes ao sinal óptico após o início da gravação do sinal de potencial. O tempo indicado em baixo de cada quadro está associado à escala de tempo da figura IV.3A. O primeiro quadro mostrado representa o instante onde a frente de onda atinge o eletrodo de medida do potencial extracelular, 35 s. Este instante corresponde ao pico máximo **b** do sinal óptico da luz ortogonalmente espalhada na IPL. O instante de tempo do segundo quadro mostrado, 80 s, corresponde ao pico mínimo **c**. O último quadro corresponde ao segundo pico máximo **d**, 185 s.

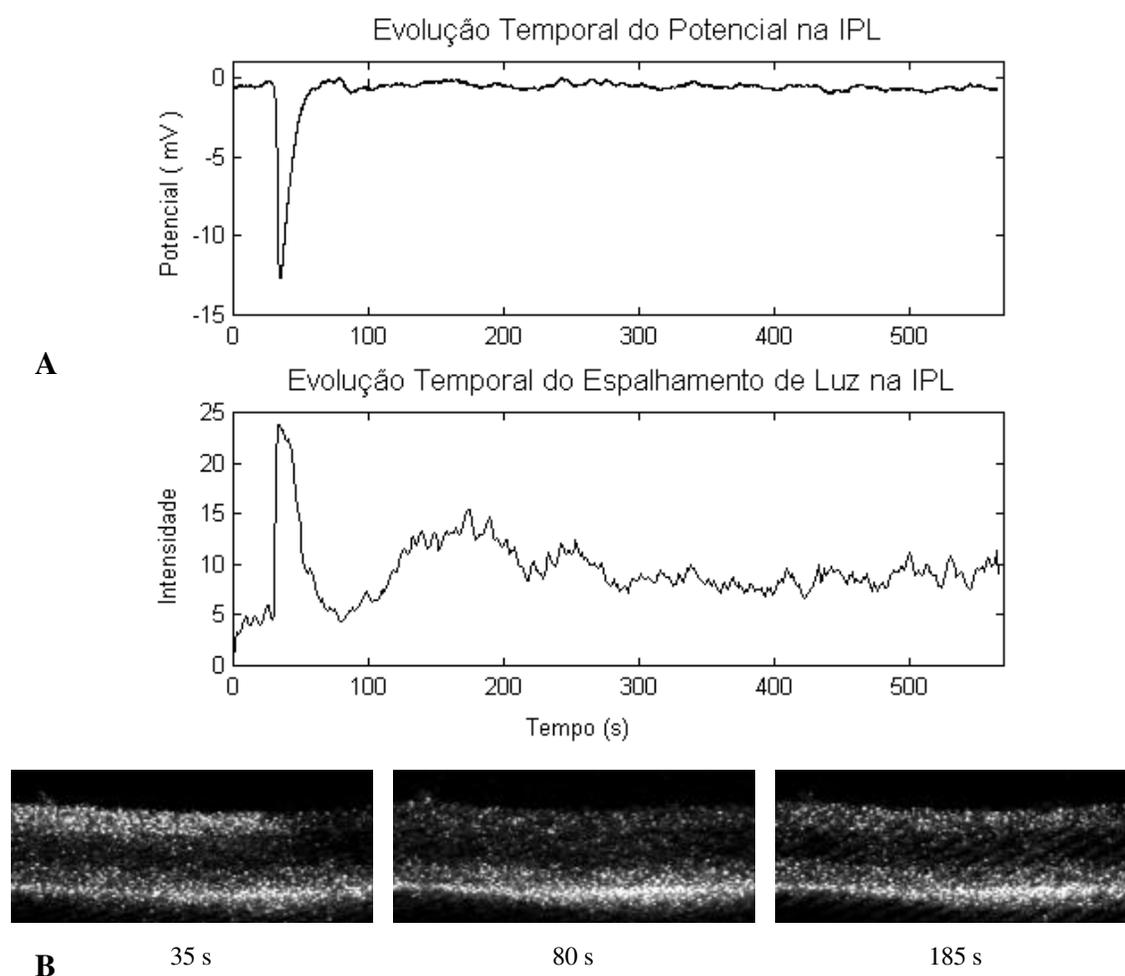


Fig. IV.3 - **A** - Registro simultâneo do potencial DC extracelular (superior) e variações de intensidade do sinal óptico na IPL (inferior) obtido do ETEL associado. O início da gravação de ambos os sinais são coincidentes durante a onda de DA; **B** - Quadros digitalizados, em instantes particulares. Os números abaixo de cada quadro indica o tempo decorrido após o início da gravação do sinal de potencial. Os quadros nos instantes 35, 80 e 185 s correspondem ao espalhamento de luz da retina no pico máximo **b**, no pico mínimo **c**, e no pico máximo **d**.

IV.1.2 - VARIAÇÃO DA ESPESSURA DA RETINA DURANTE A ONDA DE DA

A montagem experimental permitiu a obtenção de informações relativas à variação da espessura da IPL durante uma onda de DA. A figura IV.4 mostra uma imagem digitalizada do instante da passagem de uma onda de DA na retina. A construção da ETEL, para esta onda, foi feita com uma coluna resultante da média de uma janela retangular, de 13 colunas por 280 linhas onde cada pixel corresponde a $1,5 \mu\text{m}$, de cada imagem seqüencial da passagem da onda de DA. A imagem resultante está apresentada na figura IV.5. Nesta imagem pode-se, qualitativamente, observar a variação da espessura da IPL e da retina (entre as linhas 40 e 240) e o comportamento espaço temporal da onda de DA. Pode-se observar ainda uma variação do espalhamento de luz também na camada correspondente aos *endfeet*.

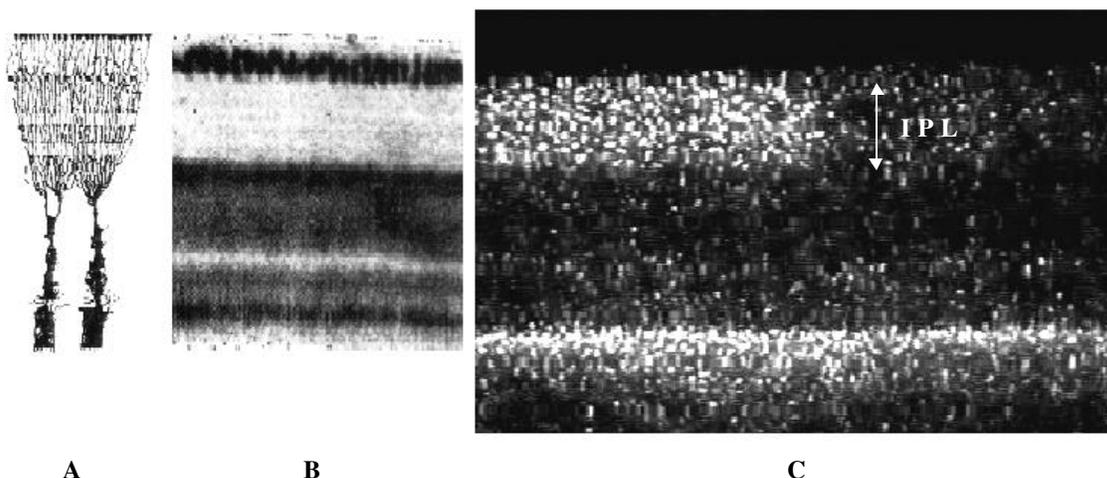


Fig. IV.4 - **A** - Células de Müller da retina de ave. (Modificada de NEWMAN, 1989); **B** - Imagem digitalizada das camadas da retina de ave (Modificada de LADEWIG *et al.*, 1998) **C** - Imagem digitalizada da passagem da onda de DA na retina por luz espalhada. Praticamente todo o sinal óptico se encontra na camada plexiforme interna conforme relatado na literatura.

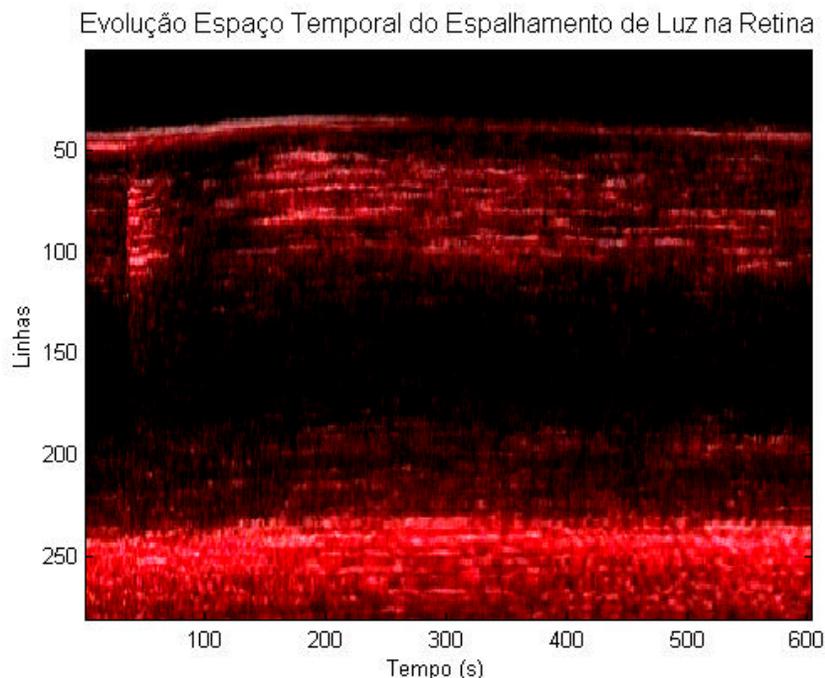


Fig. IV.5 - Evolução temporal e espacial do espalhamento de luz durante a onda de DA em retina de ave.

Para a construção da figura IV.6, retirou-se da figura IV.5 uma janela correspondente à IPL (linhas de 35 a 95) e calculou-se a média dos valores dos pixels de cada coluna desta janela. A linha resultante é correspondente à evolução temporal da intensidade de luz espalhada. A figura IV.6A apresenta uma região do tecido que abrange a IPL e a camada dos *endfeet*. A figura IV.6B apresenta a evolução temporal da intensidade da luz espalhada na IPL correspondente na figura IV.6A.

IV.1.3 - VELOCIDADE DA FRENTE DE ONDA DE DA NA RETINA

Variações no espalhamento de luz nas camadas da retina, durante a passagem da onda de DA, podem ser registradas com a utilização da técnica proposta neste trabalho. A figura IV.4C mostra um quadro onde a frente de onda de DA pode ser vista. Nesta figura, o aumento do espalhamento de luz na IPL pôde ser claramente identificado ao ser comparado com o espalhamento das outras camadas. MARTINS-FERREIRA (1983) comenta que para se obter a velocidade de propagação da onda de DA é suficiente medir-se a velocidade de propagação do sinal óptico. Um PFT obtido a partir de uma seqüência de imagens gravadas durante a passagem de uma onda típica está apresentada na figura IV.7. Cada janela

retangular, constituída de 48 linhas por 640 colunas da IPL, representa 1 segundo na escala de tempo. A escala espacial de cada imagem, oriunda da ampliação utilizada no microscópio, é tal que um pixel representa $1,1 \mu\text{m}$ ou $1,1 \times 10^{-3} \text{ mm}$. Assim, a velocidade desta onda de DA é $3,7 \text{ mm/min}$. Ela foi determinada calculando-se a tangente do ângulo θ na figura IV.7. A aplicação deste método em um conjunto de sete ondas individuais resultou em um valor médio e respectivo intervalo de confiança para a média (distribuição t, de Student, $p = 0,005$) de $4,85 \pm 0,81$ em solução normal e temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

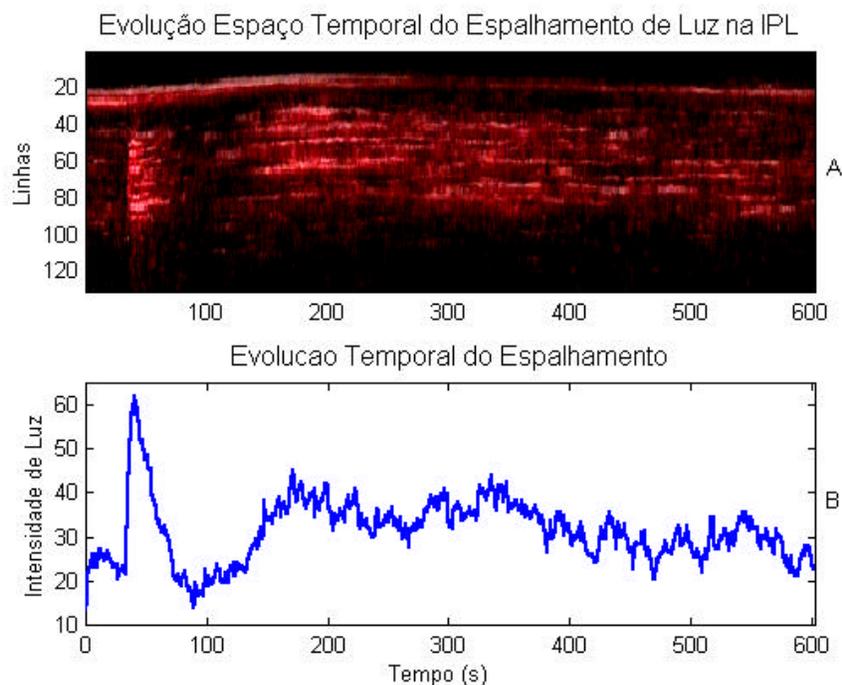


Fig. IV.6 - **A** - Evolução Espaço Temporal do espalhamento de luz em torno da camada plexiforme interna; **B** - Evolução Temporal da intensidade de luz relativa à camada plexiforme interna. Este gráfico XY corresponde à média das linha de 35 a 95 da imagem de A.

Na figura IV.8, utilizando-se o mesmo método para a determinação da velocidade da frente de onda, é mostrada a colisão de duas ondas de DA. A onda da esquerda foi iniciada por estímulo mecânico e a onda da direita foi iniciada espontaneamente. Um conjunto de 28 quadros consecutivos foi utilizado para observar a velocidade de propagação. Cada janela retangular, dessa imagem, é composta de 36 linhas por 640 colunas correspondentes à camada plexiforme interna. O intervalo de tempo entre cada um dos 28 quadros corresponde a 0,25 segundos na escala de tempo. Este tempo corresponde a uma taxa de amostragem de quatro quadros por segundo na seqüência da onda de DA.

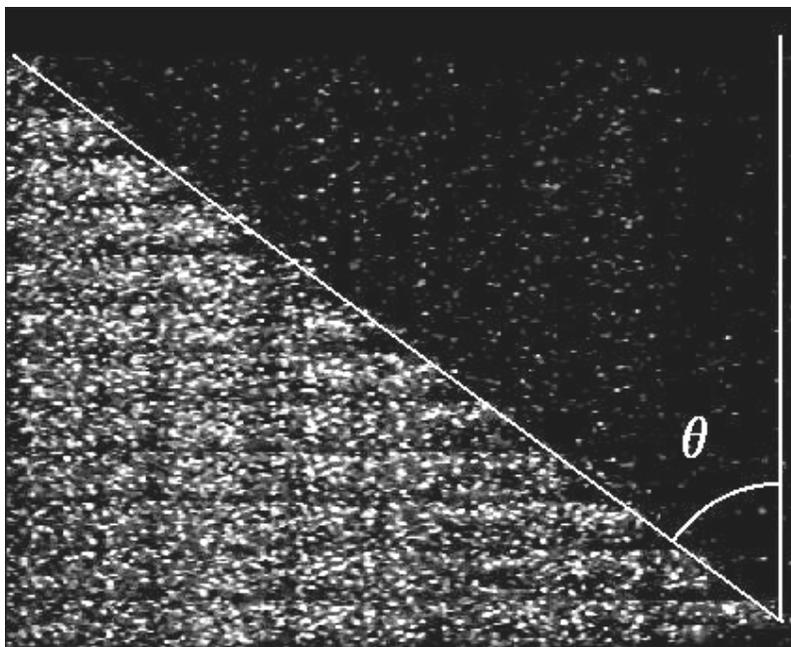


Fig. IV.7 - Propagação da velocidade da frente de onda de 12 quadros consecutivos iniciados no topo da figura. Cada janela retangular é composta de 48 linhas por 640 colunas da IPL. Cada janela retangular representa 1 s na escala de tempo. Esta onda apresenta uma velocidade de 3,7 mm/min.

O perfil em **U** da velocidade da frente de onda pode ser visto na figura IV.8B salientado em sua borda por uma linha em branco. Este perfil representa um aumento na velocidade da frente de onda na região de colisão. A colisão das duas curvas ocorre na região em torno do vértice da curva em branco. Se a velocidade da frente de onda permanecesse uniforme nessa região, seu perfil deveria ser em forma de um **V**, como as curvas em branco mostram na figura IV.8C.

IV.1.4 - RAZÃO ENTRE OS PICOS **b** E **d** DO SINAL ÓPTICO

A trajetória de um raio de luz, neste texto, foi dividida em duas grandes componentes: uma é chamada de luz retro-espalhada e a outra de luz refratada. A luz retro-espalhada não atravessa o tecido. Ela atinge a superfície de incidência do tecido e emerge no mesmo meio incidente em um determinado ângulo. A luz refratada, que atravessa o tecido, é por sua vez decomposta em três outros tipos: a transmitida, caracterizada quando a luz atravessa toda a espessura do tecido, a ortogonalmente espalhada, quando a luz emerge do tecido em um ângulo aproximado de 90° em relação ao eixo do feixe incidente, e a luz

absorvida, quando a luz não emerge do tecido e é perdida em seu interior por absorção. Considera-se que a um aumento na amplitude da luz retro-espalhada corresponderá a uma redução da amplitude da luz refratada e, conseqüentemente, a um decréscimo nas amplitudes da luz ortogonalmente espalhada e transmitida e vice versa.

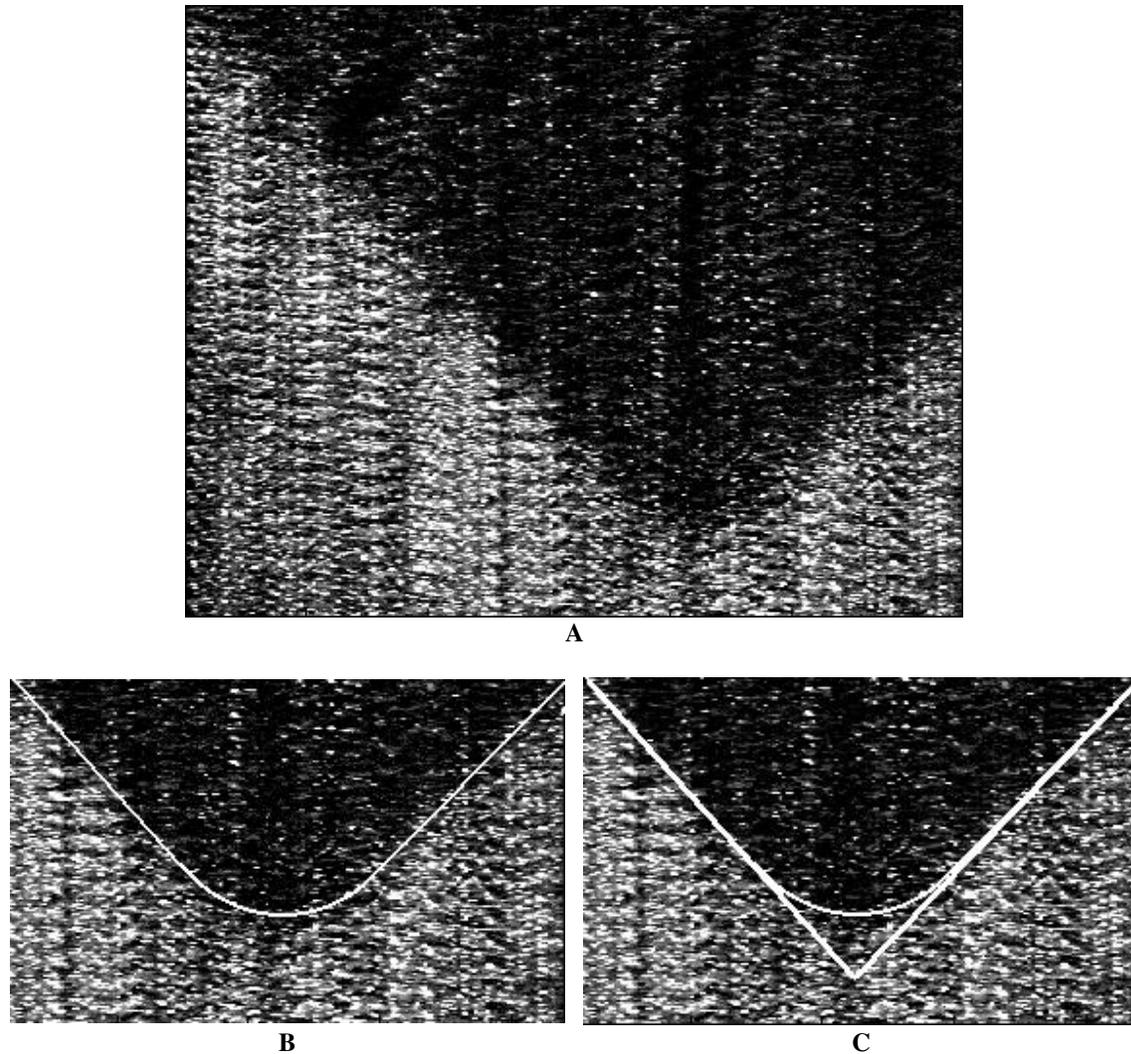


Fig. IV.8 - Propagação da velocidade da frente de onda de 28 quadros consecutivos iniciados no topo da figura. A onda de DA à esquerda foi iniciada por estímulo mecânico e aquela à direita foi iniciada espontaneamente em solução nutriente normal em 30°C. Cada janela retangular é composta de 36 linhas por 640 colunas da IPL. Cada janela retangular representa 0,25 s na escala de tempo. **A:** Velocidade de propagação de duas frentes de onda cuja colisão ocorre na região com espalhamento de luz com perfil em U. **B:** Detalhamento mostrando o aumento da velocidade na região de colisão. **C:** Detalhamento mostrando o perfil da velocidade caso não existisse alterações na velocidade de propagação

Os resultados experimentais da medição de luz ortogonalmente espalhada mostraram uma razão entre as intensidades dos picos **b** e **d**, na faixa do vermelho, maior que aquela correspondente ao comprimento de onda na faixa do verde. A figura IV.9 apresenta estas razões entre os picos **b** e **d**, para 10 ondas de DA, para cada tipo de *laser* incidente. Os valores médios das razões e os respectivos intervalos de confiança para a média (distribuição t, de Student, $p = 0,005$) são: $0,96 \pm 0,09$ (comprimento de onda na faixa do verde) e $1,16 \pm 0,10$ (faixa do vermelho). Esses valores mostram que não há interseção entre as faixas de variação das razões. Na faixa do verde tem-se o valor máximo de 1,05 e na faixa do vermelho tem-se o valor mínimo de 1,06. Aplicando-se um teste, para diferença de duas médias do tipo t, de Student, $p < 0,002$, foi verificado que as duas médias são estatisticamente diferentes.

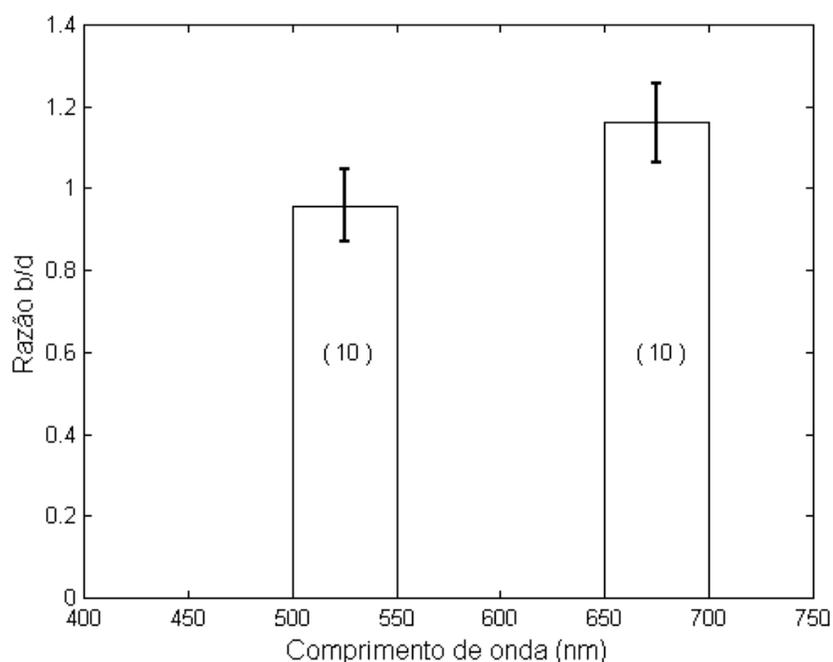


Fig. IV.9 - Razões médias, com os respectivos intervalos de confiança para a média (distribuição t, de Student, $p = 0,005$), entre os picos **b** e **d** de um total de 20 ondas de DA em retina de ave. Os números entre parênteses referem-se às quantidades de ondas para cada comprimento de onda.

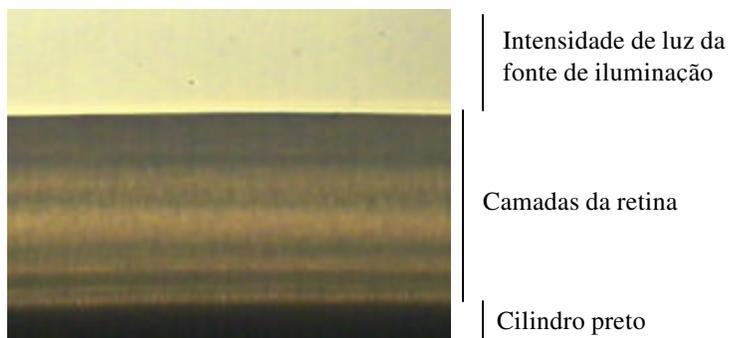
IV.2 - INFLUÊNCIA DA OSMOLARIDADE EXTRACELULAR SOBRE ESPALHAMENTO DE LUZ

Os experimentos com o espalhamento de luz na retina enfocam sua dependência da osmolaridade do meio extracelular. O procedimento, para fazer variar a osmolaridade de um meio hipotônico até um meio hipertônico, consistiu da perfusão de soluções nutrientes

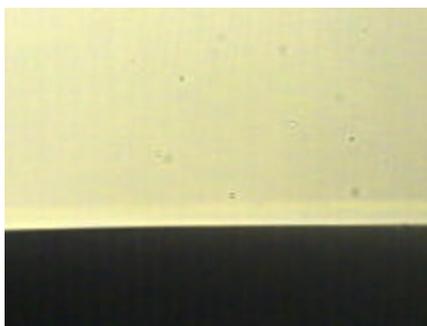
de tal modo a fazer variar continuamente a concentração de NaCl de 60 a 140 mM e de 140 para 60 mM. Os experimentos foram iniciados mantendo-se a retina em meio hipotônico por pouco tempo (da ordem de 5 min). Assim, espera-se que a osmolaridade do meio extracelular varie de um valor inferior a outro superior à osmolaridade dos meios intracelulares. A contínua perfusão de solução nutriente com 140 mM de NaCl permitiu a excursão da osmolaridade como desejado. O cloreto de sódio foi escolhido por não alterar dramaticamente a excitabilidade da retina, como ocorre com o cloreto de potássio. Utilizou-se, ainda, na composição da solução nutriente o cloreto de magnésio, na concentração de 4 mM, com o intuito de reduzir a excitabilidade da retina e evitar ondas espontâneas de DA.

IV.2.1 - EXPERIMENTOS COM LUZ BRANCA TRANSMITIDA

A perfusão rápida e contínua de uma solução hipertônica, tempo de perfusão em torno de 18 minutos, foi efetuada para alterar mais pronunciadamente a osmolaridade extracelular em relação à intracelular, a qual, em conseqüência do aumento da osmolaridade extra, foi alterada em decorrência dos efeitos da difusão e pressão osmótica. A figura IV.10 mostra imagens da retina, cujo posicionamento foi definido na figura III.1B, em diferentes momentos da perfusão, onde pode-se observar os diferentes níveis de luz transmitida. No quadro número 1, a retina se encontra em meio hipotônico, antes da perfusão hipertônica. Observa-se que é possível identificar suas camadas e que a espessura da retina, neste meio hipotônico, é maior que aquela correspondente em um meio hipertônico como, por exemplo, aquela que pode ser vista no quadro 6. O quadro número 2 mostra a retina após o término da perfusão e com a solução da cuba completamente substituída com solução nutriente hipertônica. Observa-se nos quadros 2, 3 e 4 que a transmitância através da retina é baixa. Os quadros 3 a 7 representam, respectivamente, as condições de transmitância 50, 80, 110, 140 e 150 min após o início da perfusão com solução extracelular hipertônica. Observou-se a variação da transmitância e a redução da espessura da retina com o passar do tempo. Durante a transição da solução hipo para hipertônica, houve uma dramática redução da luz transmitida. Esta redução pode ter sido conseqüência tanto da resposta às alterações da geometria do espaço extracelular, quanto da resposta às variações da osmolaridade que, por sua vez, provocam alterações no índice de refração relativo.



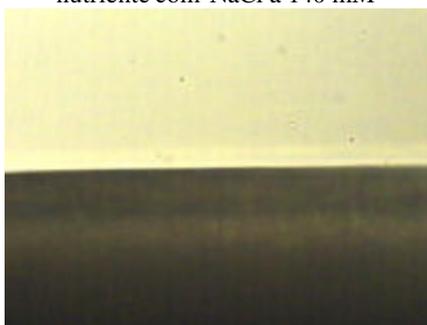
1) Retina em solução nutriente com NaCl a 60 mM



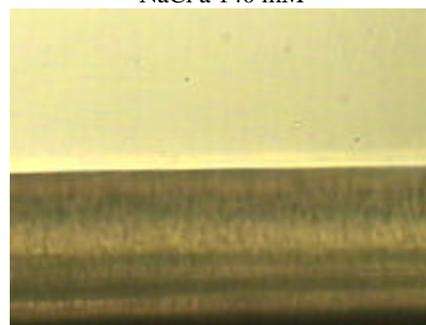
2) Retina, após o término da perfusão com solução nutriente com NaCl a 140 mM



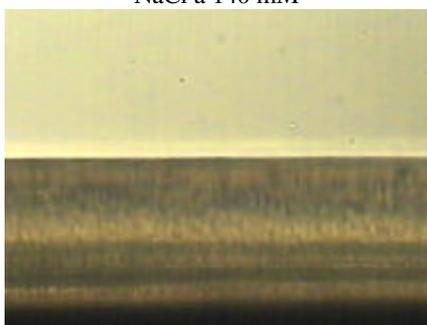
3) Retina, após 50 min em solução nutriente com NaCl a 140 mM



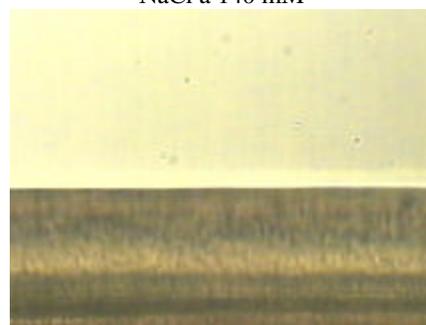
4) Retina, após 80 min em solução nutriente com NaCl a 140 mM



5) Retina, após 110 min em solução nutriente com NaCl a 140 mM



6) Retina, após 140 min em solução nutriente com NaCl a 140 mM



7) Retina, após 150 min em solução nutriente com NaCl a 140 mM

Fig. IV.10 - Variação da luz transmitida em função da variação da osmolaridade do meio extracelular do espaço extracelular. Uma perfusão rápida e contínua foi feita com solução nutriente com NaCl a 140 mM a partir de uma condição de solução nutriente com NaCl a 60 mM.

A figura IV.11 mostra a medida, para um experimento, da variação contínua da transmitância em função da variação estimada da concentração de cloreto de sódio no meio extracelular, desde a condição de meio hipotônico até a condição hipertônica. Durante esta variação, observa-se um valor máximo para a luz transmitida que, segundo a equação de Snell (Apêndice I), corresponde ao instante no qual o índice de refração relativo é igual à unidade onde não há refração. Com a evolução da perfusão, chega-se a um valor mínimo.

A intensidade de luz, para o caso de luz branca transmitida, foi determinada pela razão, representada em porcentagem, entre a intensidade de luz média de uma janela de amostragem na camada de interesse (IPL) e uma outra janela idêntica na área relativa à intensidade de luz da fonte de alimentação (vide faixa superior do quadro da figura IV.10).

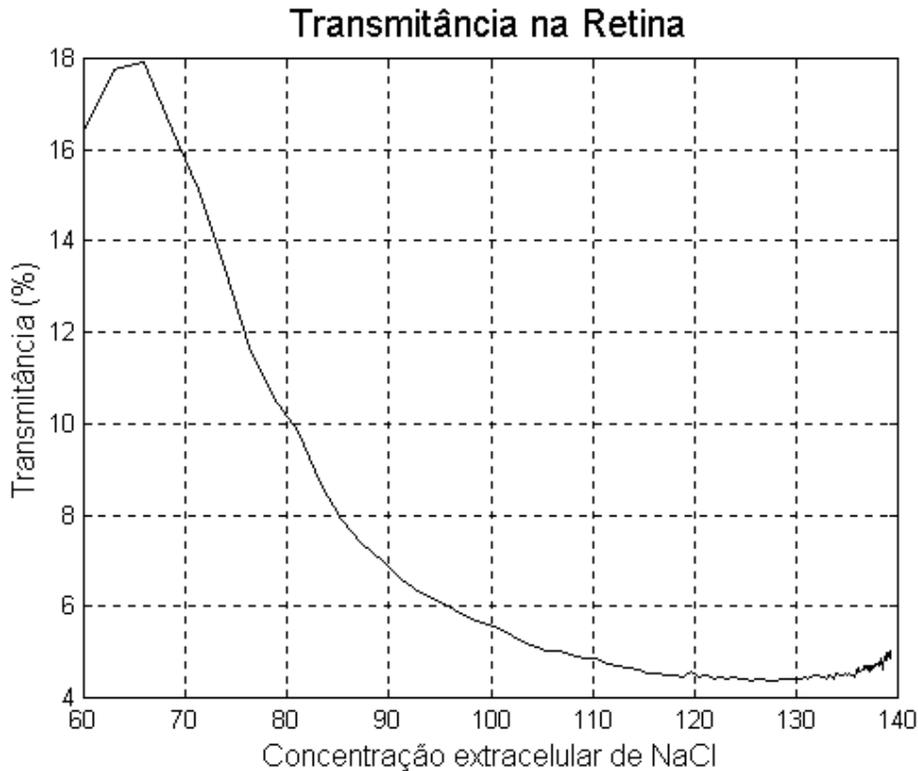


Fig. IV.11 - Variação da Transmitância em função da concentração extracelular estimada de NaCl. Perfusão rápida e contínua feita com solução nutriente com concentração de NaCl em 140 mM em uma cuba com solução nutriente com concentração inicial de NaCl em 60 mM.

Decorridos 120 minutos de repouso da retina em solução com 140 mM de NaCl, fez-se nova perfusão rápida e contínua com solução nutriente hipotônica. Antes desta perfusão, a osmolaridade do meio intracelular se encontra em um valor próximo daquele

correspondente ao meio extracelular, considerando que o equilíbrio osmótico foi quase atingido. Neste caso, o índice de refração relativo sai de um valor maior que a unidade para um valor menor que a unidade. A transmitância aumenta de valor, passa por um valor máximo e depois cai novamente.

A figura IV.12 apresenta os gráficos da variação da transmitância média (sete experimentos) em função da concentração extracelular estimada de cloreto de sódio, na IPL. Para a condição de perfusão de meio hiper para hipotônico, pode-se observar que o valor máximo da transmitância não tem a mesma amplitude do valor máximo correspondente à perfusão de meio hipo para hipertônico. Além disso, os valores máximos nos dois sentidos de perfusão não ocorrem no mesmo valor estimado para a concentração de NaCl dentro cuba. Considera-se que estas diferenças observadas na transmitância deve-se à estrutura geométrica do espaço extracelular que não é a mesma para os dois sentidos de perfusão.

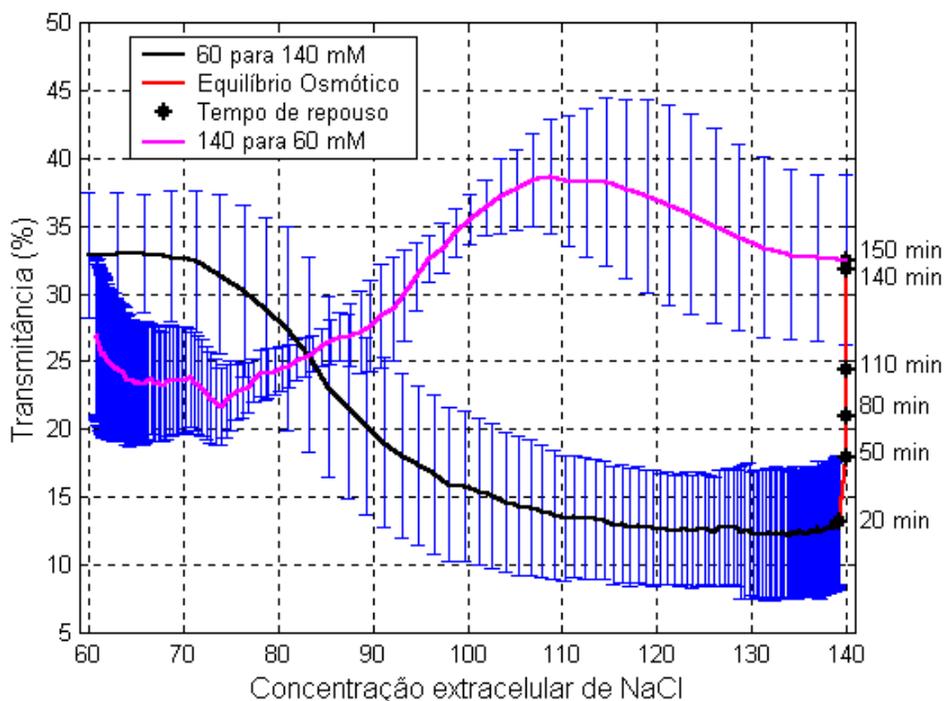


Fig. IV.12 - Variação da transmitância em função da concentração extracelular de NaCl. Perfusão rápida e contínua feita com solução nutriente com concentração de NaCl em 140 mM em uma cuba com solução nutriente com concentração de NaCl inicial em 60 mM. No sentido inverso, perfusão rápida e contínua feita com solução nutriente com concentração de NaCl em 60 mM após decorridos 150 minutos de repouso da retina em solução nutriente com concentração de NaCl em 140 mM. Curvas representam valores médios e as barras verticais os desvios padrões; número de experimentos: $n = 7$.

IV.2.2 - EXPERIMENTOS COM *LASER*

A luz detectada, neste caso, é aquela espalhada na direção perpendicular ao plano de incidência do *laser*. Este tipo de espalhamento foi denominado de ortogonalmente espalhado. Utilizou-se duas fontes de *laser*: uma na faixa do vermelho e outra na faixa do verde. Os experimentos com *laser* foram realizados com os mesmos procedimentos de perfusão utilizados naqueles de luz branca transmitida. Os resultados dos experimentos com fontes de *Laser* foram agrupados em relação à faixa do comprimento de onda. Os resultados relativos ao comprimento de onda na faixa do vermelho foram normalizados em relação ao experimento que apresentou o maior valor de intensidade de luz e apresentados em porcentagem. Analogamente, os resultados relativos ao comprimento de onda na faixa do verde foram normalizados e apresentados em porcentagem.

A figura IV.13 apresenta os resultados dos experimentos para dois tipos de *laser* incidindo sobre a retina. A figura IV.13A apresenta os resultados de luz espalhada para o *laser* com comprimento de onda na faixa do vermelho. A figura IV.13B apresenta os resultados de luz espalhada para o *laser* com comprimento de onda na faixa do verde. Pode-se observar que, ao final da perfusão da solução hipo, há uma tendência de aumento do espalhamento. Esta mesma tendência também está presente nos experimentos com luz branca transmitida para condições experimentais idênticas.

Os resultados experimentais mostram que a variação da osmolaridade extracelular, ao longo dos dois tipos de perfusão e também no período de repouso, altera o espalhamento de luz na retina segundo uma dinâmica semelhante ao primeiro quadrante de um ciclo de histerese, com padrão centrado na origem de um sistema de eixos cartesianos.

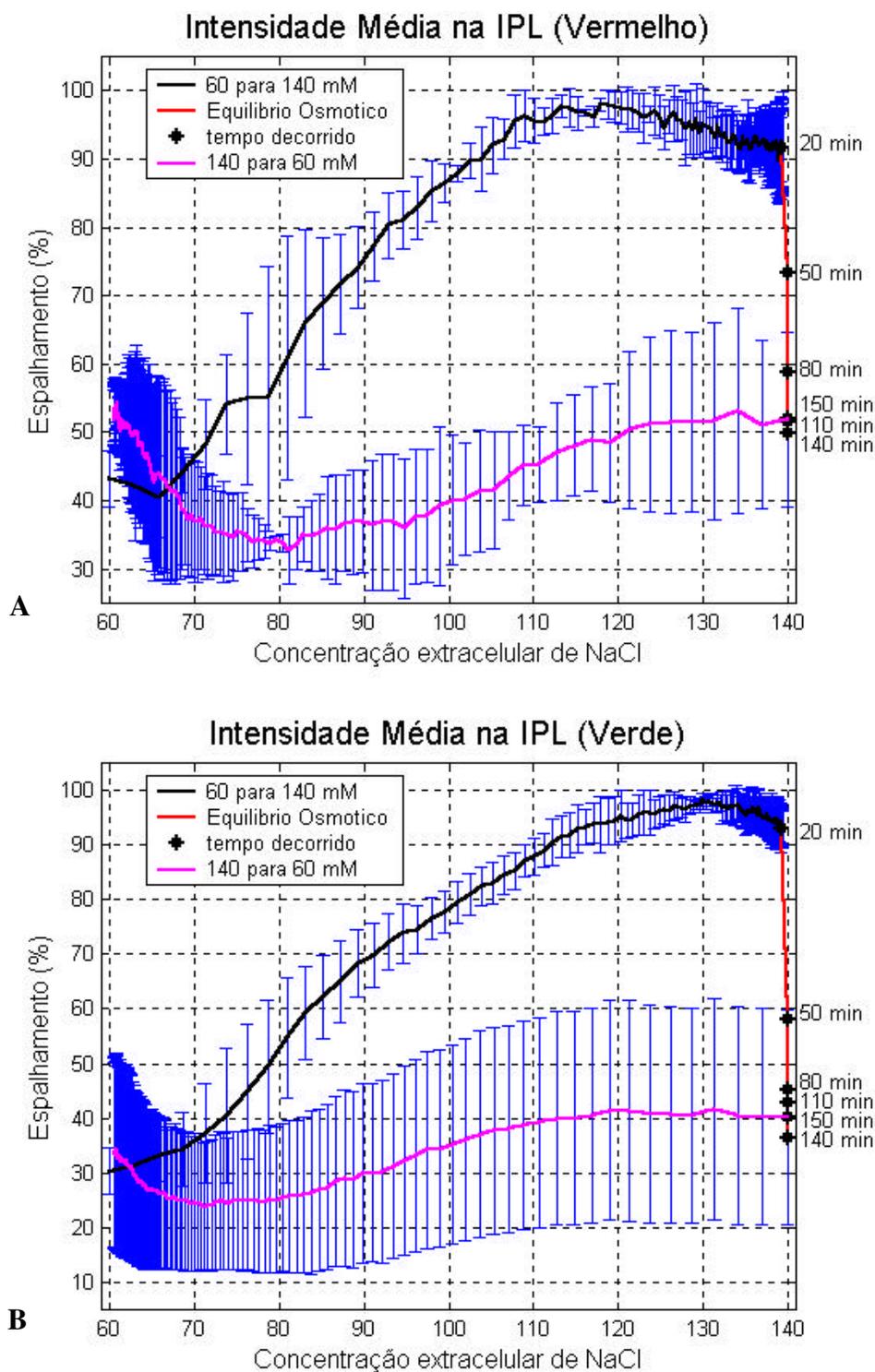


Fig. IV.13 - Variação do espalhamento médio de luz na camada plexiforme interna da retina de ave. **A:** gráfico da intensidade de luz espalhada em função da concentração extracelular de NaCl com a utilização de *laser* na faixa do vermelho; Curvas representam valores médios e as barras verticais os desvios padrões; $n = 7$. **B:** gráfico da intensidade de luz espalhada em condições experimentais idênticas, mas com *laser* verde incidindo sobre a retina. Curvas representam valores médios e as barras verticais os desvios padrões; $n = 6$.

IV.2.2.1 - VARIAÇÃO DA ESPESSURA DA RETINA

A partir da ETEL aplicada nos experimentos de osmolaridade variável, pode-se observar a variação da espessura da retina durante a perfusão da solução hipotônica. Neste caso, a transparência da retina permite a visualização ao longo do processo de perfusão. Observa-se que a luz espalhada é majoritária também na IPL. A figura IV.14 apresenta um caso típico da evolução temporal e espacial da intensidade de luz, variando desde uma condição hipertônica equilibrada para uma condição hipotônica não equilibrada, situação equivalente à perfusão hipotônica, com luz incidente na faixa do vermelho e do verde. A imagem inferior, na figura IV.14A, mostra uma imagem onde se fez a correção da movimentação da borda superior da retina, vista na imagem superior da mesma figura, durante a perfusão. Analogamente, a figura IV.14B mostra um conjunto idêntico de figuras de outro experimento, mas com o *laser* na faixa do verde. Esta correção foi feita para facilitar a visualização dos efeitos da variação da osmolaridade, sobre a geometria da IPL, no experimento. Na condição hipertônica, a retina se apresenta menos transparente e a luz espalhada ocupa todo o campo captado pela câmera CCD. Neste caso, não é possível monitorar a variação da borda inferior da retina durante o processo de perfusão.

Por outro lado, pode-se ter a variação da espessura da IPL em pontos distintos ao longo dos processos de perfusão desde a condição hipertônica equilibrada para a condição hipotônica e no final da perfusão hipotônica. A tabela IV.1 apresenta os valores médios e respectivos erros padrões da média para quatro situações específicas: retina imersa em SN; retina imersa, por aproximadamente 2 minutos, em solução nutriente hipotônica; retina imersa, por aproximadamente 18 minutos, em solução hipotônica e finalmente a retina imersa, por aproximadamente 130 minutos, em solução hipertônica. Os valores da espessura da IPL foram normalizados em relação ao valor encontrado para a condição de imersão em solução nutriente normal. Os números entre parênteses se referem ao número de experimentos realizados. Considerando-se o valor médio em solução nutriente normal como referência (espessura da IPL 81 μm) o aumento da espessura (em soluções hipotônicas) bem como sua redução (solução hipertônica) podem ser determinados da tabela IV.1.

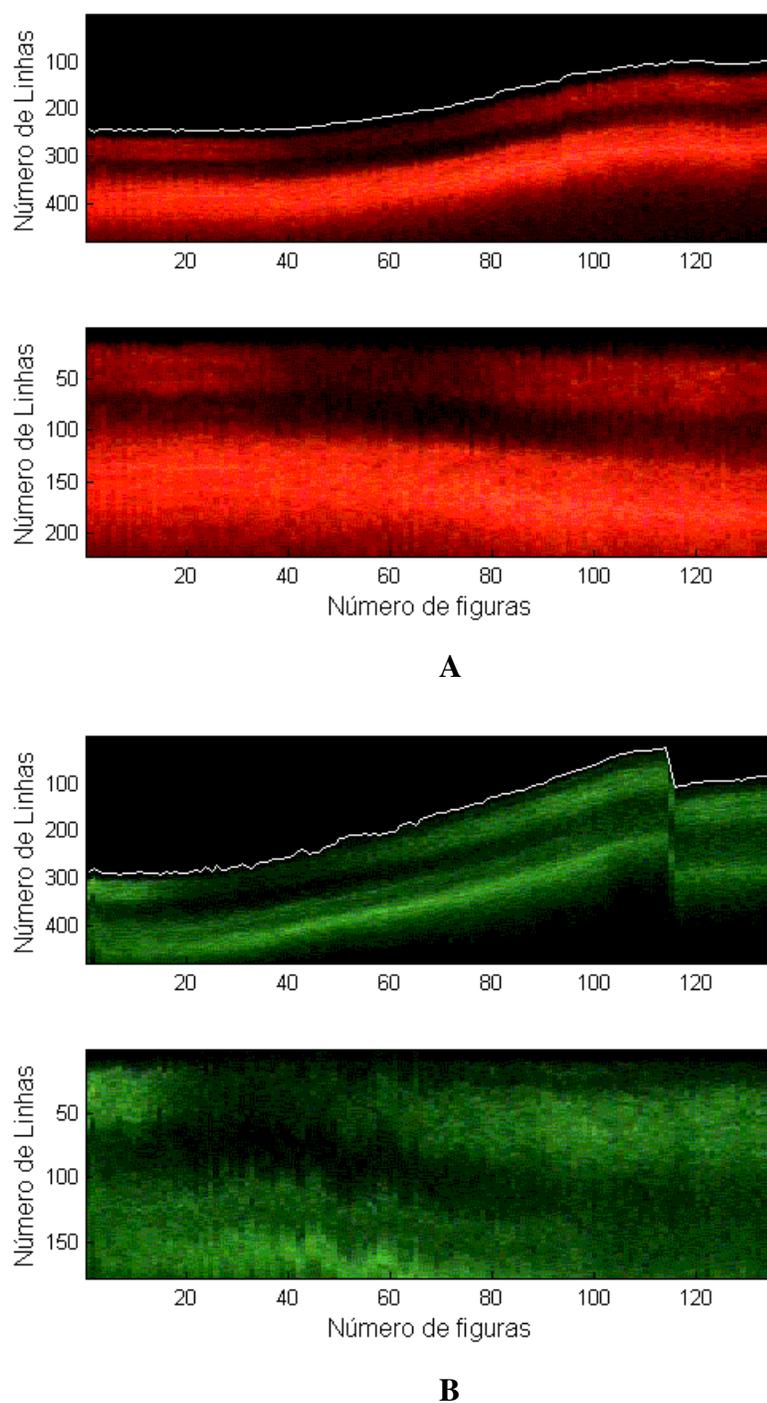


Fig. IV.14 - Evolução temporal (número de figuras x 8 segundos) e espacial da intensidade de luz espalhada, mostrando a variação da espessura da IPL, durante o processo de perfusão de solução hipotônica a partir da condição hipertônica. **A** - Variação da espessura da IPL com *laser* na faixa do vermelho. **B** - Variação da espessura da IPL com *laser* na faixa do verde. O total de figuras utilizadas é igual a 135.

Tabela IV.1 - Variação da Espessura da IPL em Diferentes Soluções nutrientes. Os dados estão na forma de média \pm EPM (Erro Padrão da Média) normalizados em relação ao valor da espessura da IPL (aproximadamente 81 μm) em solução nutriente normal. Entre parênteses é apresentado o número de experimentos realizados.

| TIPO DE SOLUÇÃO NUTRIENTE | LASER VERMELHO | | LASER VERDE | |
|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | Normal | 1,00 \pm 0,02 | (9) | 1,00 \pm 0,02 |
| 02 min Hipotônica | 1,14 \pm 0,02 | (7) | 1,15 \pm 0,03 | (6) |
| 18 min Hipotônica | 1,21 \pm 0,03 | (6) | 1,21 \pm 0,04 | (6) |
| 130 min Hipertônica | 0,96 \pm 0,05 | (7) | 0,94 \pm 0,04 | (6) |

IV.3 - INJEÇÃO IONTOFORÉTICA DE K^+

Uma vez que há uma grande movimentação iônica na frente de onda de DA e conseqüente alteração do espalhamento de luz, a injeção de potássio na IPL, por iontoforese, deve alterar os espalhamento de luz local. Se provocada uma onda de DA, após esta injeção, o potássio deve ser absorvido durante a passagem da onda.

A figura IV.15 mostra uma imagem de resposta óptica (montagem para luz branca transmitida) de um experimento com iontoforese de K^+ na camada plexiforme interna da retina. A imagem é resposta a uma injeção de uma corrente de potássio de 320 nA durante 70 s, por meio de uma micropipeta de 1,5 μm de diâmetro preenchida com 3M de KCl.

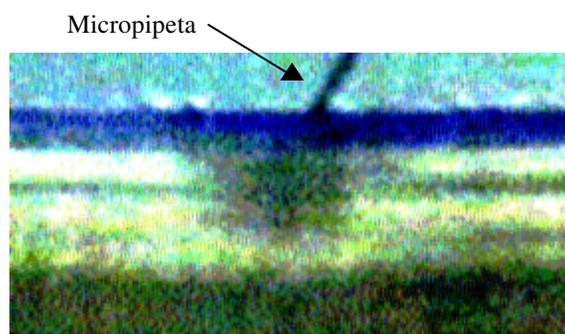


Fig. IV.15: Injeção de potássio, por iontoforese, na camada plexiforme interna da retina. Injeção de 320 nA de corrente de potássio durante 70 s.

A injeção de potássio parece ter sido capaz de alterar a osmolaridade do meio extracelular. Essa injeção, na camada plexiforme interna da retina, parece ter provocado a alteração do espalhamento de luz. Esta alteração na luz transmitida através da retina pode

ser vista na figura IV.15 e identificada pela região escura em torno da ponta da pipeta de injeção.

Para a comprovação de que a região escura não está relacionada à lesão no tecido, provocou-se uma onda de DA após a injeção de potássio. A seqüência de imagens mostradas na figura IV.16 mostra o resultados deste experimento. Após à injeção de potássio, iniciou-se a onda de DA, por estímulo mecânico, provocando sua propagação pelo tecido. As imagens revelam claramente uma alteração na luz transmitida na região da iontoforese: quadros 1 e 2. No quadro 3, observa-se o momento em que a onda de DA atinge o eletrodo de injeção. A onda é observada como uma sombra que ocupa a metade do campo da retina em observação. Essa sombra deve-se a uma redução na luz transmitida através do tecido. No quadro 4, a onda ocupa todo o campo e o quadro 5 mostra que a retina ainda permanece em condição de baixa transmitância. No quadro 6, após 60 s da passagem da frente da onda sobre a ponta da pipeta, a retina apresenta-se com uma transparência maior que aquela do início do experimento e a região de injeção de potássio aparece completamente recuperada. Durante a passagem da frente de onda de DA, todo o potássio injetado foi removido.

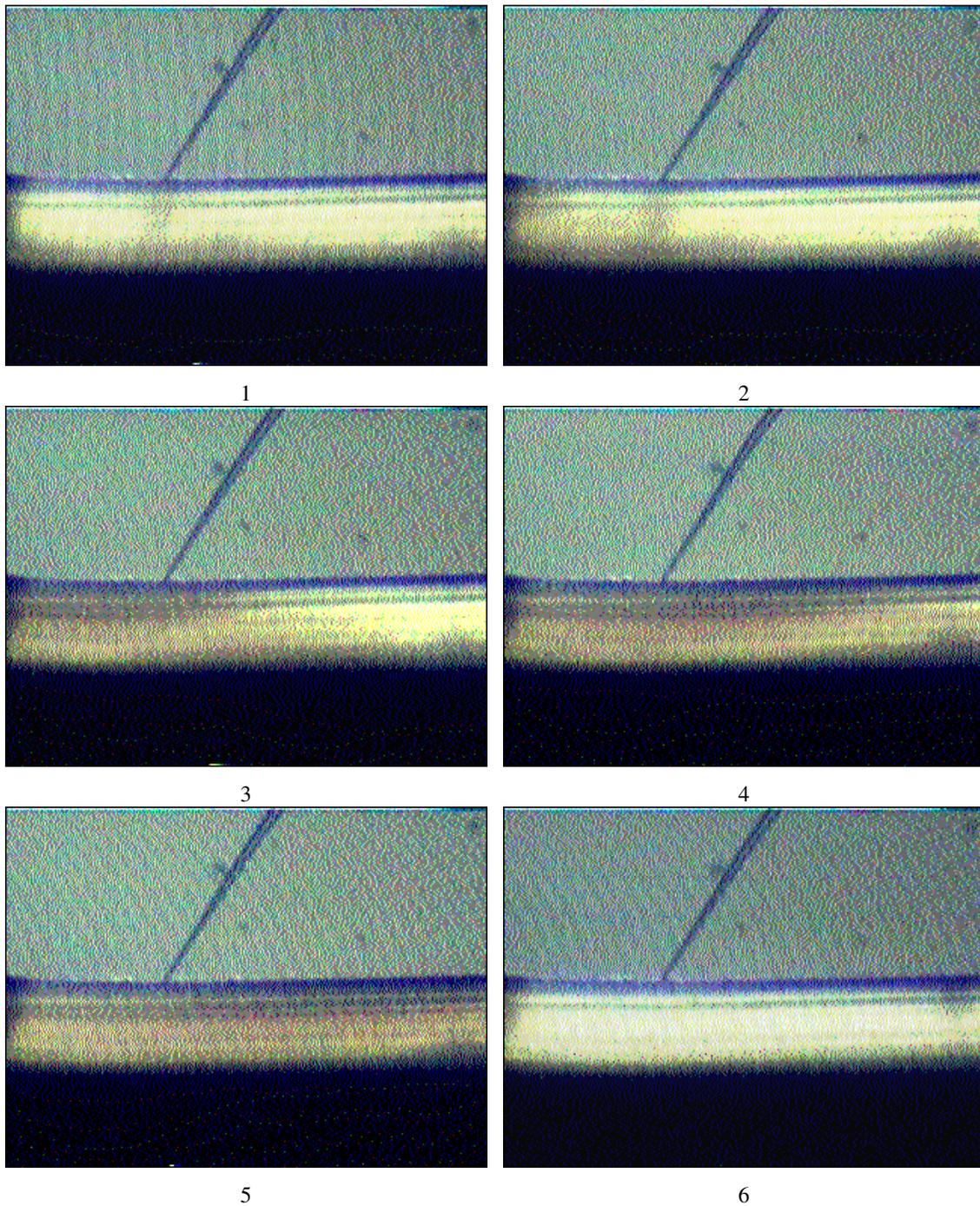


Fig. IV.16 - Seqüência de imagens correspondentes a quadros subseqüentes à injeção de potássio, por iontoforese, na IPL de uma retina. A montagem utilizada para visualização da retina permite observar as camadas do tecido sem um corte transversal. As camadas observadas nas imagens estão intactas. Quadro 1: espalhamento após a injeção de potássio (região escura em torno da ponta da pipeta de injeção); 2: entrada da frente de onda na região em foco; 3, 4, 5: registros da passagem da onda de DA na região de observação; 6: quadro correspondente à um instante de alta transparência da retina (pico c do sinal óptico). A absorção do potássio injetado é total. Imagens tratadas apenas com ajustes no brilho e no contraste.

CAPÍTULO V - MODELO MATEMÁTICO E SIMULAÇÕES

Dentre as possíveis origens do espalhamento de luz na retina, durante a DA, duas hipóteses foram consideradas para se explicar a seqüência do espalhamento de luz: os efeitos da geometria do tecido, e a variação do índice de refração relativo entre os meios intra e extracelular. Os resultados experimentais dos registros do espalhamento de luz presentes na literatura (MARTINS-FERREIRA e OLIVEIRA CASTRO, 1966, OLIVEIRA CASTRO e MARTINS-FERREIRA, 1970) justificaram essas hipóteses.

O primeiro modelo, implementado computacionalmente, consistiu da simulação da trajetória de raios de luz na IPL através da óptica geométrica (conceitos básicos no Apêndice I) com base na lei de Snell. Esta camada foi considerada em particular, em razão de microfotometrias (MARTINS-FERREIRA e OLIVEIRA CASTRO, 1966 e OLIVEIRA CASTRO e MARTINS-FERREIRA, 1970) que mostraram ser a IPL a responsável pela maior componente do sinal óptico. Se as hipóteses da literatura são verdadeiras, então um raio, dentro da IPL, teria sua trajetória modificada, nas transições entre os meios extra e intracelulares, pelo índice de refração relativo, que representaria a movimentação iônica entre os meios intra e extracelular, e pela geometria do espaço extracelular, que representaria a movimentação de água também entre esses dois meios. A simulação considerou que, para cada dimensão do espaço extracelular, o índice de refração relativo podia variar dentro do intervalo [0,25, 1,75].

Com base nas hipóteses da influência do índice de refração e geometria sobre a transmitância, utilizadas na simulação do espalhamento por óptica geométrica, o segundo modelo implementado consistiu da simulação da transmitância de luz, na IPL, através de uma função constituída de uma família de curvas de distribuição normal e sigmóides. A transição entre as curvas, na função representativa da transmitância, foi controlada através do índice de refração relativo e do volume intracelular. A variação da geometria do espaço extracelular, neste caso, não variou de forma discreta como no caso da simulação por óptica geométrica. A geometria do espaço extracelular foi continuamente variada e controlada pelo índice de refração relativo e o volume intracelular.

V.1 – SIMULAÇÃO DA ÓPTICA GEOMÉTRICA

A camada plexiforme interna foi representada por um conjunto de regiões independentes, cujos interiores representaram os meios intracelulares e, o espaçamento entre elas, representou o espaço extracelular. Para uma melhor aproximação da geometria, a disposição das regiões não foi regular. A representação da geometria permitiu a variação do espaço extracelular de uma disposição aleatória para outra lamelar. Esta variação representou a expansão do espaço intracelular, por influxo de água, quando ocorre um aumento da concentração iônica neste meio. A figura V.1 mostra dois diagramas que representam a disposição aleatória das regiões intra e extracelulares. A figura V.1A mostra uma situação onde o espaço extracelular tem dimensões aleatórias e irregulares. Já a figura V.1B mostra a situação onde o espaço extracelular é reduzido, pelo aumento do espaço intracelular, forçando as interfaces a assumirem uma disposição mais paralela ou com uma representação lamelar do tecido.

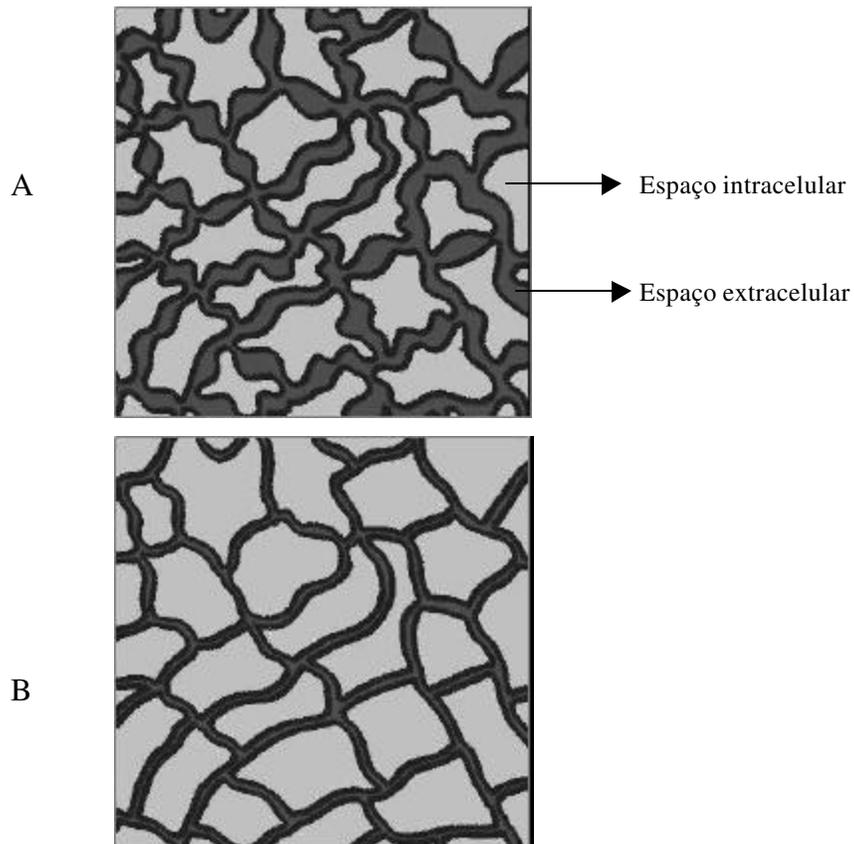


Fig. V.1 - Representação geométrica da camada plexiforme interna por microregiões. a) O espaço extracelular apresenta uma disposição aleatória e irregular da IPL; b) o espaço extracelular apresenta uma disposição lamelar da IPL por aumento do espaço intracelular.

V.1.1 – DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO ALGORITMO DE SIMULAÇÃO

A trajetória dos raios de luz, na transição entre meios de diferentes índices de refração, foi determinada pela lei de Snell e pelo produto vetorial entre dois vetores, representativos dos raios incidentes e refratados, e a normal ao plano de incidência. Na figura V.2, apresenta-se o diagrama esquemático do algoritmo de simulação de raios de luz na IPL através da óptica geométrica. As normais à face de incidência do raio foram a cada momento sorteadas através de um gerador de números aleatórios não tendencioso. Esse sorteio representou apenas a disposição irregular das regiões, como são irregularmente dispostos os terminais dendríticos.

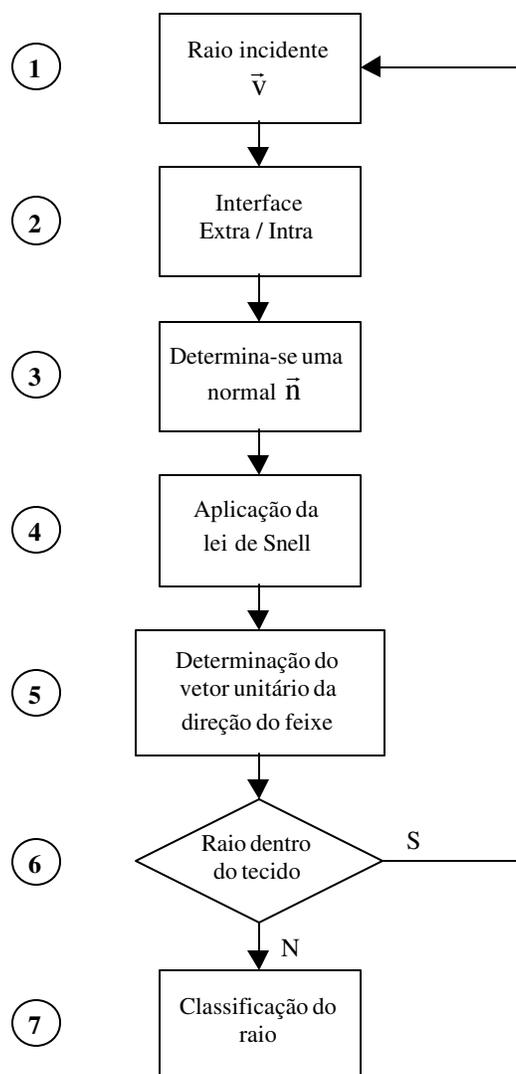


Fig. V.2: Diagrama esquemático do algoritmo representativo da simulação da IPL, através de modelagem pela óptica geométrica. Os blocos de 1 a 6 representam as ações executadas ao longo da simulação.

Bloco 1 – Considerando-se o sistema de eixos tridimensional xyz , a base circular do cilindro circular reto, representativo da IPL, tem seu centro no ponto $(0,0,0)$ e raio igual a $100\ \mu\text{m}$, sendo coincidente com o plano $z = 0$. Um vetor cujas coordenadas x e y assumem valores no intervalo $[-100, 100]\ \mu\text{m}$ e coordenadas z dentro do intervalo $[0,-100]\ \mu\text{m}$ se encontra dentro do cilindro. Caso contrário, o vetor está fora do cilindro. A coordenada z , representou a espessura da IPL. Na primeira iteração, o raio entrou no tecido com um ângulo de 90° em relação ao plano $z = 0$ e obrigatoriamente foi uma interface do meio extra para o intracelular. Nas iterações seguintes, o vetor \mathbf{v} , representativo do raio incidente em cada interface, recebeu o vetor unitário da direção de deslocamento. Um vetor de deslocamento representou a trajetória dos raios que foram classificados como refletidos ou refratados.

Blocos 2 e 3 – Nestes blocos é determinado o tipo de interface (extra/intra ou intra/extra) de incidência do raio. Uma normal ao plano de incidência foi sorteada, com grau de liberdade controlado pelo ângulo φ , quando o raio incidia do meio extra para o intracelular (figura V.3). Neste caso, a geometria do espaço extracelular foi simulada desde uma disposição aleatória, onde o ângulo φ pôde assumir valores próximos de 90° , até uma disposição lamelar, onde o ângulo φ pôde assumir valores próximos de 0° . O grau de liberdade da normal não foi controlado para incidência do raio do meio intra para o extracelular.

Bloco 4 – Com base no vetor representativo do raio incidente \mathbf{v} e no vetor normal sorteado determinou-se o ângulo de incidência α . Aplicando-se a lei de Snell, determinou-se o ângulo de refração β (figura V.3). Para β maior que o ângulo crítico, o raio foi considerado como refletido nesta interface. Caso contrário, ele foi considerado como refratado.

Bloco 5 – Através do produto vetorial entre o vetor representativo do raio refratado (refletido) e o vetor normal, determinou-se o vetor unitário da direção de deslocamento. Com este vetor, determinou-se a posição espacial do raio ao ponto de origem do sistema de eixos.

Blocos 6 e 7 – Nas simulações, foram calculadas as trajetórias de um grande número de raios. Os raios foram classificadas em refratados ou retro-espalhados (refletidos). Os raios refratados foram ainda classificados em transmitidos ou espalhados de acordo com o esquema da figura V.4. O vetor do raio incidente \vec{v} assumia o valor do vetor unitário da direção de deslocamento do raio refratado quando presente no espaço representativo da IPL. Se o raio saiu do tecido, foi verificado se a saída ocorreu pela lateral do cilindro (raio espalhado), se a saída ocorreu pela base circular do plano $z = -100 \mu\text{m}$ (raio transmitido), ou ainda se o raio saiu pela base circular do plano $z = 0 \mu\text{m}$ (raio refletido).

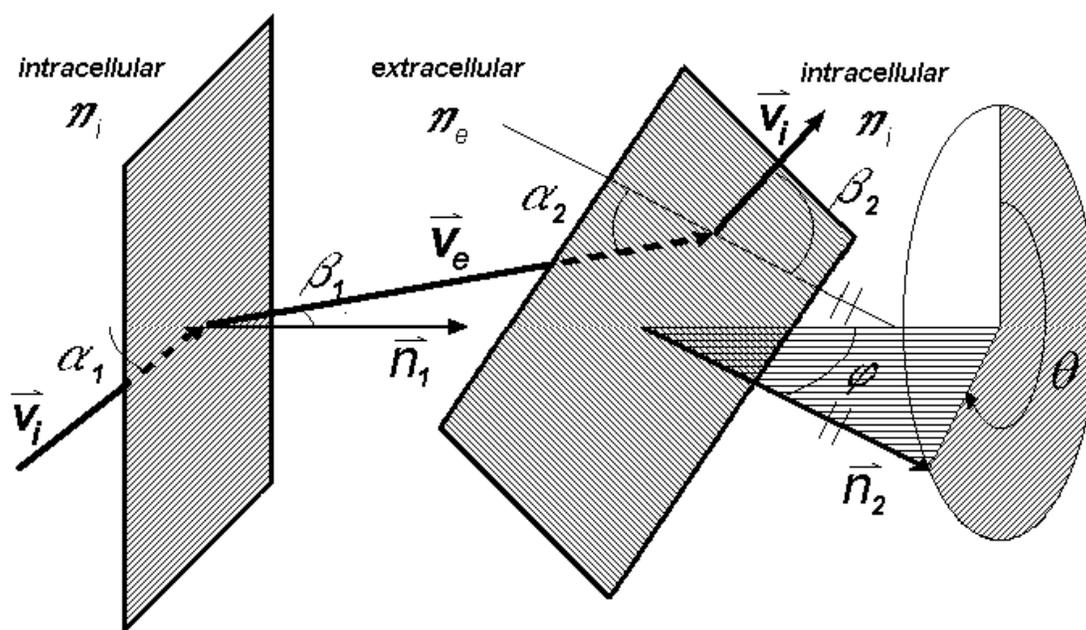


Fig. V.3 - Diagrama representativo da variação da estrutura do espaço extracelular desde uma configuração aleatória até uma configuração lamelar. O ângulo ϕ variando até 90 graus significa uma estrutura aleatória. O ângulo ϕ igual a zero graus representa uma configuração lamelar no espaço extracelular.

Sabe-se que, durante a onda de DA, ocorre uma movimentação intensa de ions (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} e Cl^-) entre os meios extra e intracelulares. Esta movimentação provoca também alterações significativas na geometria do espaço extracelular (SOMJEN *et al.*, 1986, LUX *et al.*, 1986 e NICHOLSON *et al.*, 1981). Para a simulação do espalhamento de luz na retina, admitiu-se a predominância de dois fatores que influenciam as alterações de sua seqüência: a osmolaridade e a geometria. MARTINS-FERREIRA e OLIVEIRA CASTRO

(1966) apontaram e estudaram outros fatores que também alteram a seqüência do espalhamento de luz como agentes químicos e temperatura. No entanto, buscavam o entendimento de como o espalhamento de luz era alterado durante a passagem da onda de depressão alastrante. Para tanto, abordou-se a variação da osmolaridade no tecido em função da grande movimentação iônica nos meios extra e intracelulares e também a alteração da geometria do tecido em função do efluxo e influxo de água entre os meios extra e intracelulares.

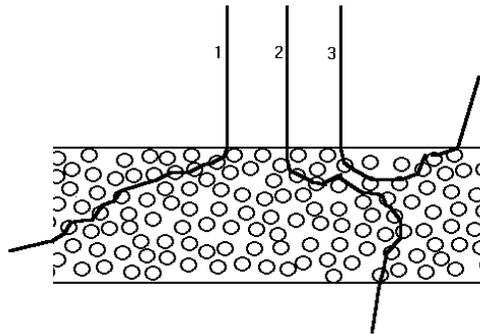


Fig. V.4: Representação da camada plexiforme interna, onde são apresentados três tipos de trajetórias para um raio: 1: raio espalhado; 2: raio transmitido e 3: raio retro-espalhado.

A osmolaridade foi simulada através da relação entre os índices de refração dos meios extra e intracelulares. Definiu-se um índice de refração relativo como sendo a razão entre o índice de refração do meio extracelular e o índice de refração do meio intracelular. O índice de refração relativo pôde variar no intervalo $[0,25, 1,75]$. Desta forma, identificaram-se regiões onde o índice de refração do meio extracelular era menor que o índice do meio intracelular, um ponto onde os dois índices eram iguais e uma outra região onde o índice de refração do meio extracelular era superior ao índice de refração do meio intracelular.

A variação da geometria foi simulada através da transição entre os estados morfológicos do tecido, de aleatório para lamelar. O ângulo φ , ângulo azimutal, que determina a orientação do vetor normal ao plano de incidência (figura V.3) na interface do meio extra para intracelular, ao invés de ser sorteado aleatoriamente, foi sorteado segundo distribuições de probabilidade com média em $\varphi = 0$ e variância aumentada progressivamente a partir de zero. Isto permitiu alterar a geometria celular e variá-la em

diferentes estados desde uma estrutura irregular de membranas celulares, variância permitida até 90° , até uma onde a estrutura era lamelar, com variância permitida de zero graus. A figura V.3 mostra um diagrama que explicita as alternativas de variação do espaço extracelular em função da variação permitida para o ângulo φ azimutal.

V.1.2 - RESULTADOS DA SIMULAÇÃO POR ÓPTICA GEOMÉTRICA

A figura V.5 apresenta as projeções das trajetórias dos raios incidentes no cilindro nos planos XY, XZ e YZ. Nessa figura tem-se o resultado de uma simulação para índices de refração relativos iguais a 0,8 (figura V.5A e figura V.5C), 1,2 (figura V.5B e figura V.5D) e 1 (figura V.5E) para um total de 20 raios incidentes. Para cada um dos índices, fez-se a simulação para uma estrutura do tecido aleatória (figuras V.5A e V.5B) e lamelar (figuras V.5C e V.5D). O resultado apresentado mostra que, para estrutura aleatória e índice de refração relativo diferente da unidade, o espalhamento dos raios no interior do tecido é elevado. Para o caso de estrutura lamelar, tem-se dois comportamentos distintos: primeiro, com o índice de refração relativo menor que a unidade, o espalhamento na IPL é semelhante àquele da estrutura aleatória, mas de menor intensidade; segundo, com o índice de refração superior à unidade, não ocorre espalhamento no interior da IPL, mas somente um deslocamento na primeira interface intra/extra e os raios são transmitidos totalmente nesta direção. Para o caso onde o índice de refração relativo é igual à unidade, os raios são totalmente transmitidos, sem deslocamento, e independente da estrutura do tecido (figura V.5E).

Uma outra forma de quantificar o espalhamento de luz na simulação é através de um gráfico que relacione o espalhamento de luz e o índice de refração relativo. A figura V.6 mostra o resultado de uma simulação para uma estrutura aleatória. Observa-se uma simetria em relação ao índice de refração unitário. Próximo do valor unitário, ocorre uma redução do espalhamento de luz e aumento da transmitância. O espalhamento é nulo quando o índice de refração é exatamente igual à unidade, correspondendo a uma transmitância máxima. A figura V.7 apresenta o resultado de simulação semelhante, mas para uma estrutura lamelar. A estrutura lamelar provoca a perda de simetria do espalhamento de luz.

Com o índice de refração relativo maior que a unidade, obtém-se uma transmitância maior para a mesma faixa de variação da osmolaridade. Esses resultados foram considerados significativos uma vez que explicitaram a sensibilidade do espalhamento de luz com a variação da osmolaridade e geometria do meio.

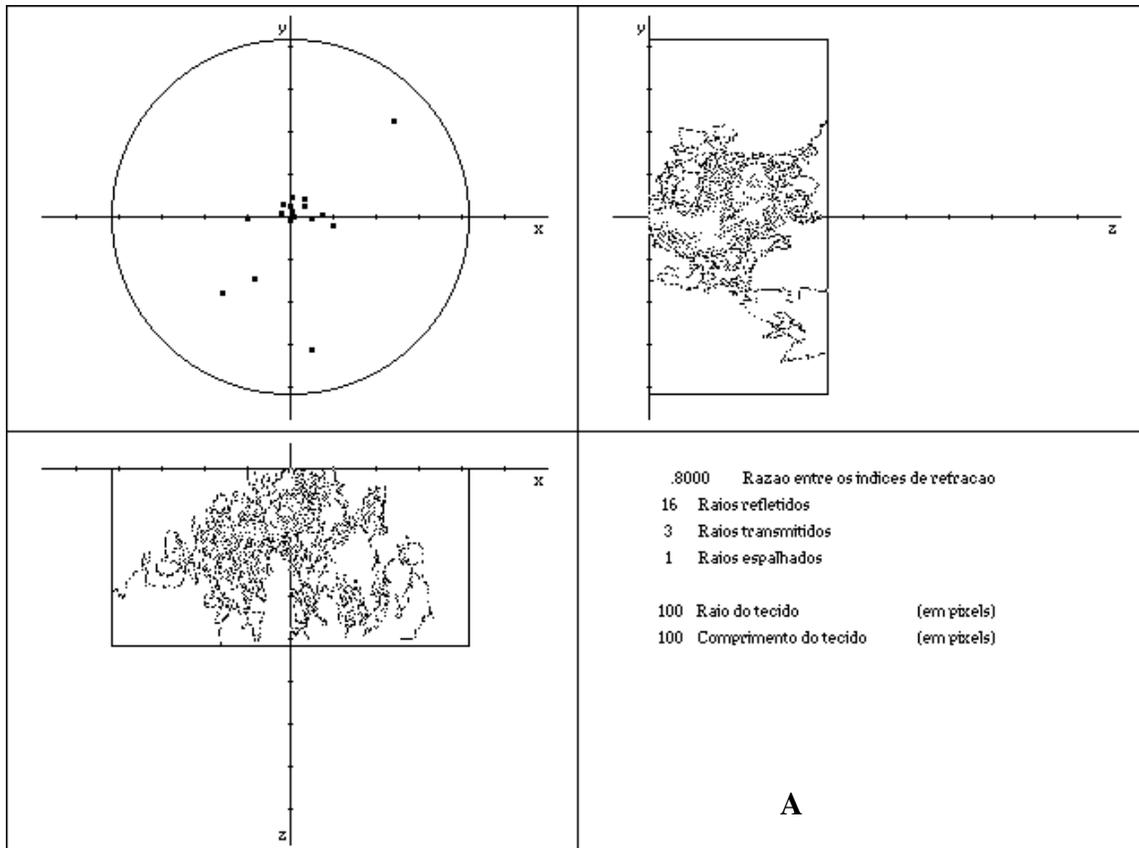


Fig.V.5A - Projeção das trajetórias de 20 raios incidentes em um cilindro sobre os planos XY, XZ e YZ. Simulação de estrutura aleatória - índice de refração relativo igual a 0,8.

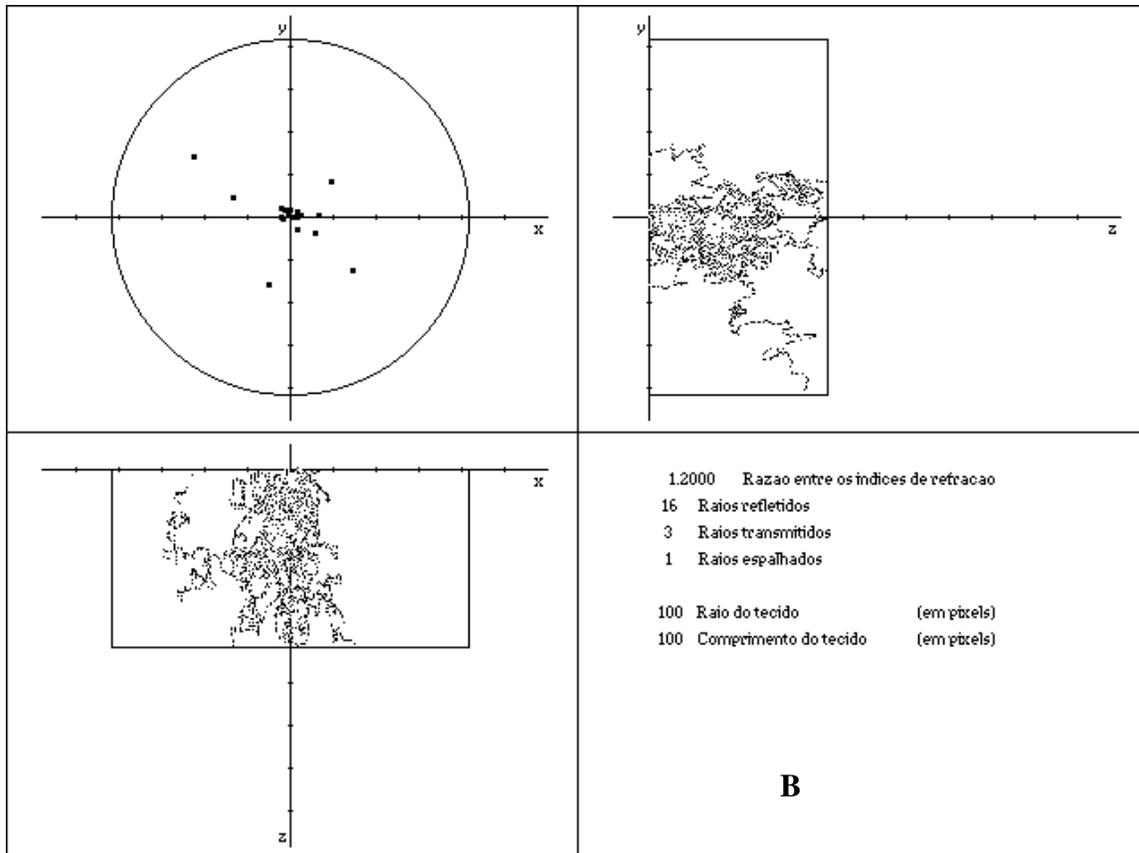


Fig.V.5B - Projção das trajetórias de 20 raios incidentes em um cilindro sobre os planos XY, XZ e YZ. Simulação de estrutura aleatória - índice de refração relativo igual a 1,2.

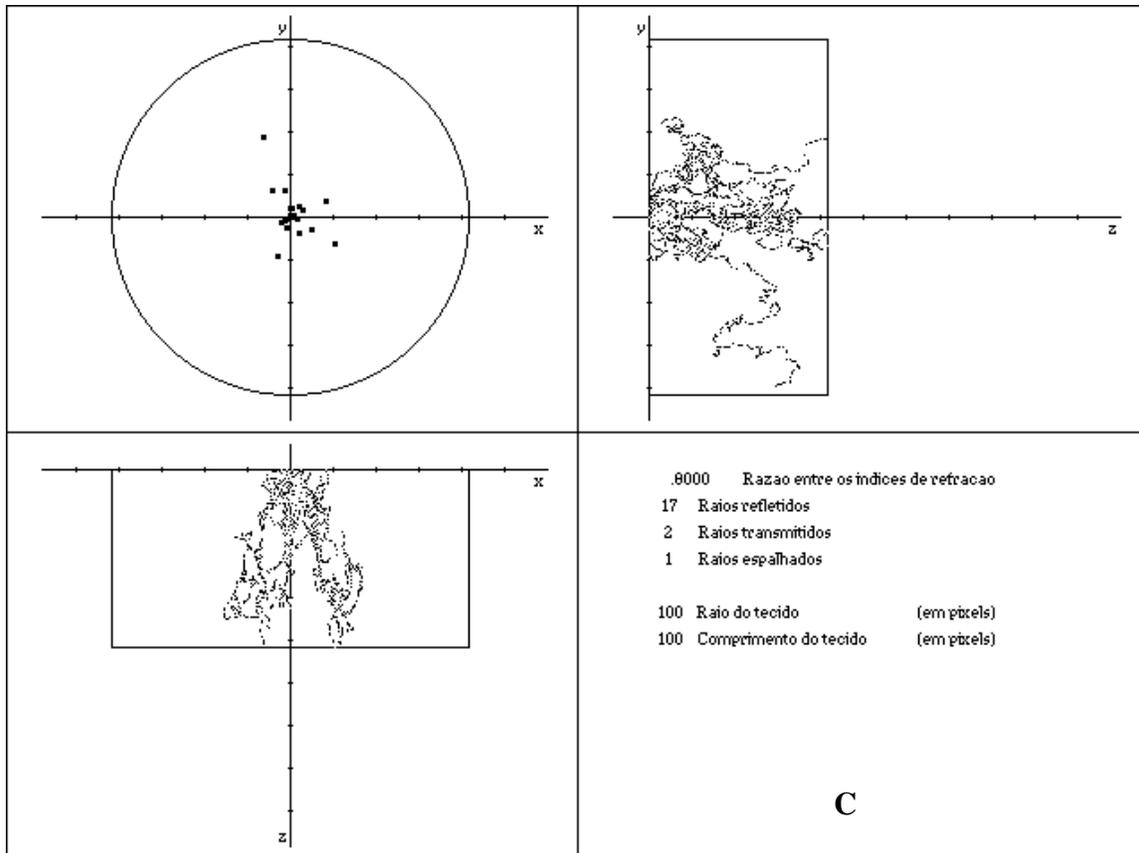


Fig.V.5C - Projeção das trajetórias de 20 raios incidentes em um cilindro sobre os planos XY, XZ e YZ. Simulação de estrutura lamelar - índice de refração relativo igual a 0,8.

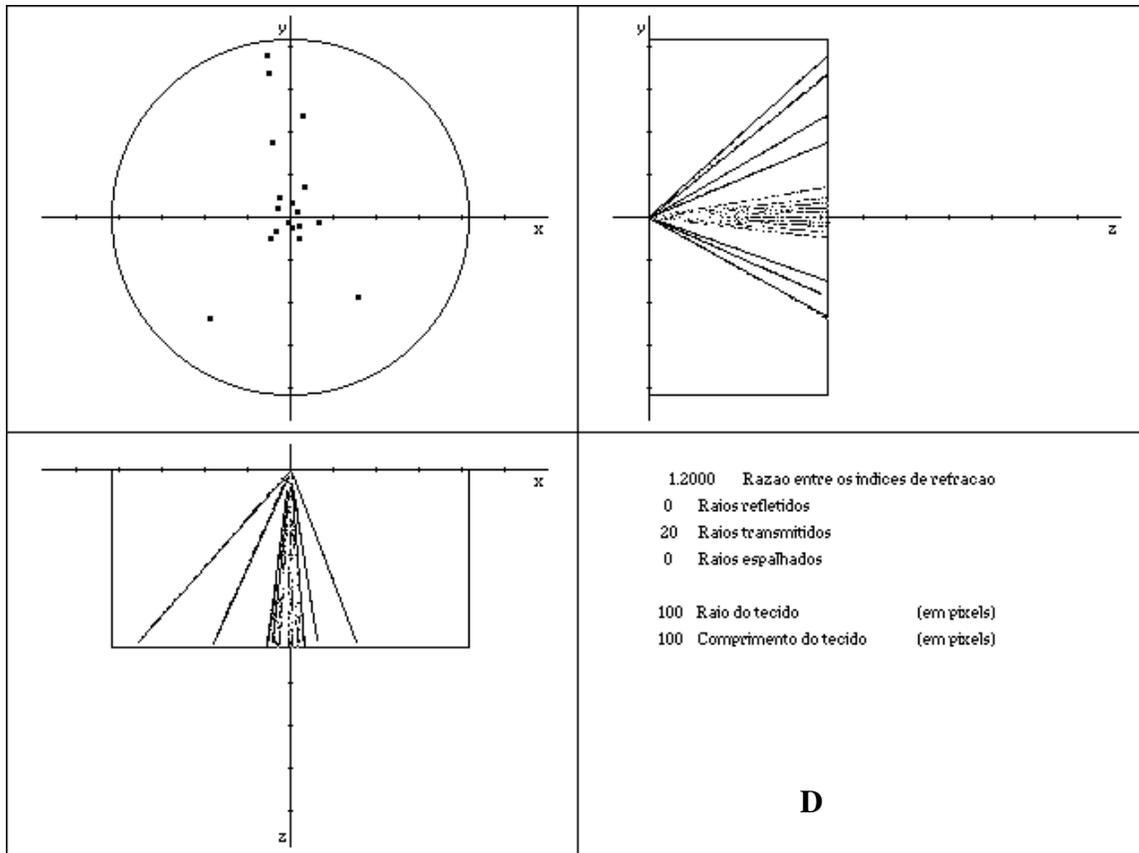


Fig.V.5D - Projecção das trajetórias de 20 raios incidentes em um cilindro sobre os planos XY, XZ e YZ. Simulação de estrutura lamelar - índice de refração relativo igual a 1,2.

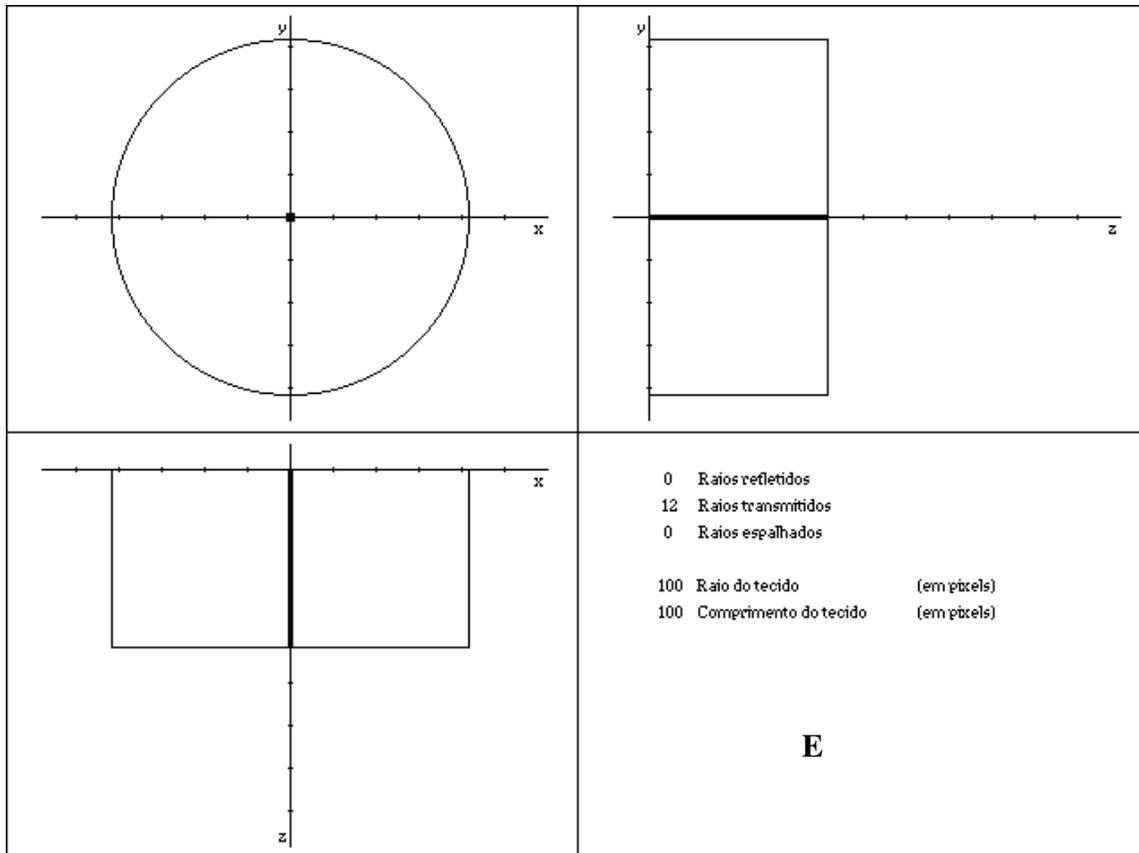


Fig.V.5E - Projeção das trajetórias de 20 raios incidentes em um cilindro tridimensional nos planos XY, XZ e YZ. - Para as duas estruturas e índice de refração relativo igual a unidade.

A figura V.8 mostra o gráfico representativo da dinâmica da transmitância de luz com a variação da geometria e da osmolaridade. A família de curvas apresentadas nesta figura foram obtidas variando-se o limite máximo permitido para o sorteio do ângulo azimutal nas interfaces entre os meios extra e intracelulares em degraus. Para cada valor máximo permitido para o ângulo azimutal, variou-se o índice de refração relativo dentro da faixa [0,25, 1,75].

Pode-se observar a grande variação do espalhamento de luz quando da transição da estrutura do tecido de aleatória ($\varphi = 90^\circ$) para lamelar ($\varphi = 0^\circ$), na situação do índice de refração relativo superior à unidade. Esta figura resume a dinâmica da variação do espalhamento de luz em função da osmolaridade e da geometria do meio. Os resultados de simulação indicam que o espalhamento de luz parece estar associado a uma ação conjunta da diferença entre osmolaridade extra e intracelulares e também da geometria.

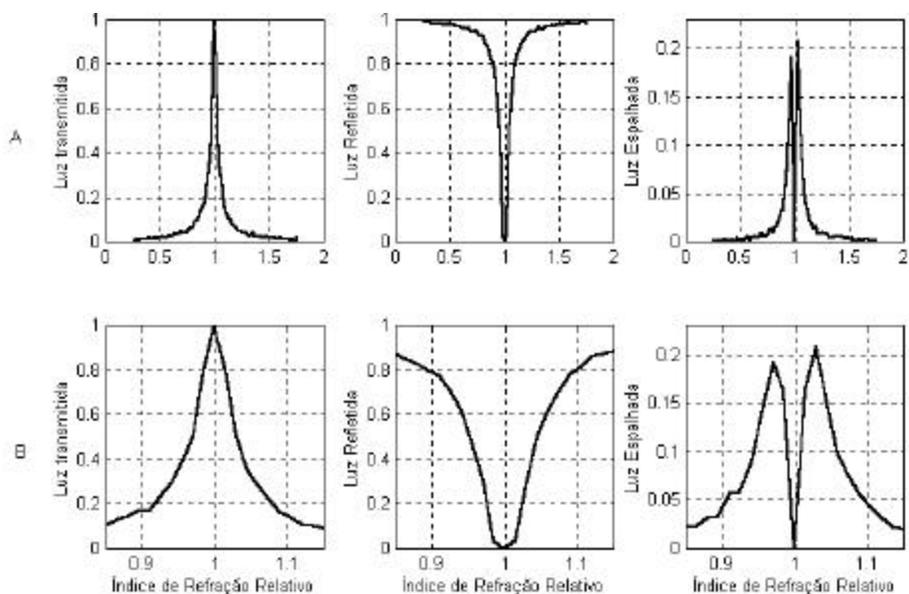


Fig. V.6 - **A** - Simulação do espalhamento de luz na camada plexiforme interna, para uma estrutura aleatória do tecido, em função do índice de refração relativo. **B** - Detalhamento em torno do valor unitário.

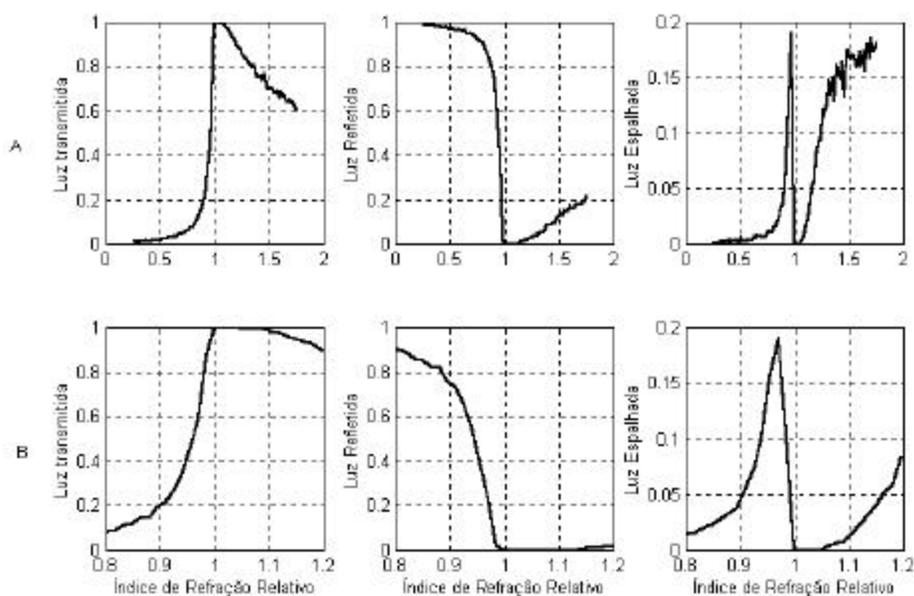


Fig. V.7 - **A** - Simulação do espalhamento de luz na camada plexiforme interna da retina, para uma estrutura lamelar do tecido, em função do índice de refração relativo. **B** - Detalhamento para região em torno do valor unitário.

A variação da transmitância com o ângulo azimutal também foi investigada apresentando uma variação exponencial (figura V.9). Quanto mais próximo de zero estiver o limite máximo do ângulo azimutal, mais rápida será a mudança na transmitância.

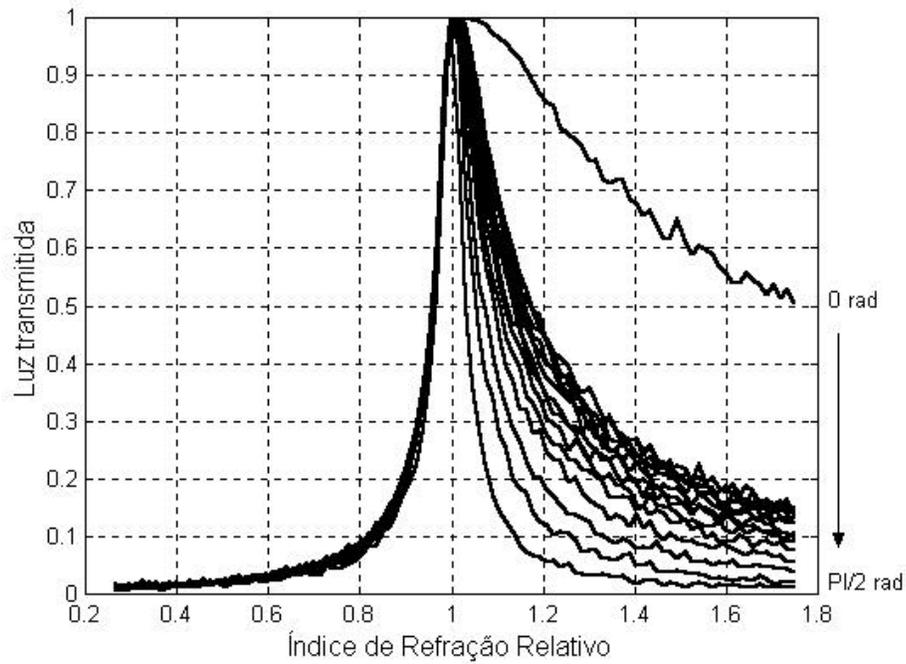


Fig. V.8 - Simulação da transmitância na camada plexiforme interna da retina para uma transição da estrutura do tecido de aleatória para lamelar e com variação da osmolaridade.

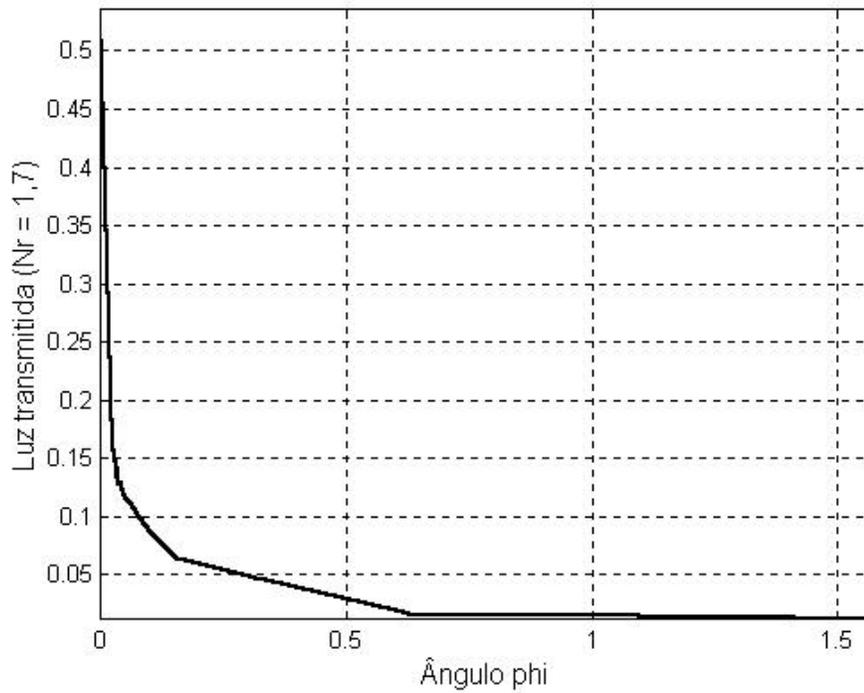


Fig. V.9 - Variação da transmitância em função do ângulo azimutal ϕ (rad). À medida que o ângulo se aproxima de zero, mais lamelar é a estrutura do tecido.

V.2 - SIMULAÇÃO DA TRANSMITÂNCIA DE LUZ

Com base na forma de onda do resultado de simulação apresentado na figura V.8, observou-se que a morfologia da curva de transmitância do sinal óptico pode ser representada por uma família de curvas de distribuição normal modulada por uma curva de ajuste constituída por duas sigmóides. Esta curva de ajuste foi utilizada para decrescimento das regiões externas ao ponto central das curvas de distribuição normal. A figura V.10A mostra uma família de curvas de distribuição normal com seu valor máximo no ponto correspondente ao índice de refração relativo unitário. A figura V.10B mostra a curva de ajuste, com ponto de inflexão das sigmóides coincidente com o índice de refração relativo unitário. A função de transmitância está apresentada na figura V.10C para alguns valores aleatórios do espaço extracelular (controlados pelo volume intracelular). Para cada valor do volume intracelular, o índice de refração relativo variou no intervalo $[0,25, 1,75]$. Esta figura tem uma variação semelhante àquela apresentada na figura V.8.

Admite-se que, para um índice de refração relativo maior que a unidade, exista uma família de curvas de distribuição normal (figura V.10C). Quando o índice de refração relativo é menor que a unidade existe uma curva de distribuição normal considerada padrão. A transição entre as curvas de distribuição normal foi controlada através do índice de refração relativo e do volume intracelular.

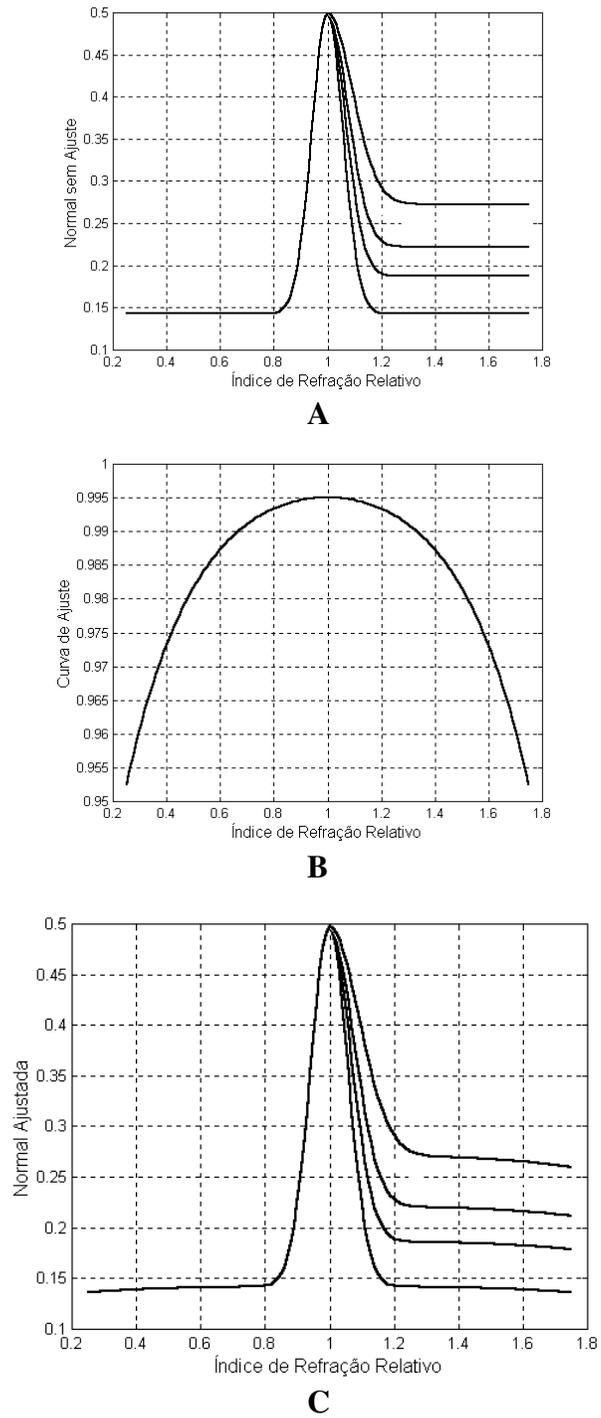


Fig. V.10 - Seqüência de definição das equações para a simulação de transmitância. **A** - Família de curvas de distribuição normal; **B** - Sigmóides para ajuste da inclinação externa das curvas de distribuição normal; **C** - Função representativa da transmitância de luz.

V.2.1 - FORMULAÇÃO MATEMÁTICA

A equação que representa a luz transmitida para um índice de refração relativo maior que a unidade é dada pelas equações V.1 e V.2.

$$t_r(t) = 25 \cdot a(t) \cdot \left(\frac{1}{b(t)} \cdot e^{-\frac{[n(t)-1]^2}{2 \cdot \left[\frac{b(t)}{12}\right]^2}} + 1,5 - \frac{1}{b(t)} \right) \quad \text{V.1}$$

$$b(t) = 1,5 \cdot v(t), \quad \text{V.2}$$

onde,

$t_r(t)$ - função transmitância

$a(t)$ - curva de ajuste de decaimento das curvas de distribuição normal

$b(t)$ - variável de compensação da variação do volume;

$v(t)$ - volume estimado do meio intracelular;

$n(t)$ - índice de refração relativo

Para o caso onde o índice de refração relativo é menor que a unidade, utiliza-se somente uma curva de distribuição ajustada. Esta curva de distribuição ajustada é calculada com a expressão anterior, onde o valor de $b(t)$ é constante e igual 0,8. Este valor de $b(t)$ é o valor necessário para que a curva de distribuição ajustada tenha valores compatíveis com o resultado experimental médio para perfusão com solução hipotônica.

A curva de ajuste $a(t)$ é função do índice de refração $n(t)$ e sua expressão é dada pela equação V.3. Para que as curvas de transmitância apresentem amplitudes diferentes nos dois sentidos de perfusão, a constante k da equação V.3 assume valores diferentes. Para o sentido de perfusão e repouso hipertônicos, k foi ajustado em 90 e para o sentido de perfusão hipotônica, k foi ajustado em 105.

$$a(t) = k \cdot \frac{[1 - \tanh(2n(t) - 5)] \cdot [1 + \tanh(2n(t) + 1)]}{4} \quad \text{V.3}$$

Se a osmolaridade total do meio extracelular é dada pelo somatório das concentrações dos ions que compõem a solução nutriente, então pode-se definir uma equação de osmolaridade em função da concentração dos ions sódio e cloreto. Assim, a expressão da osmolaridade do meio extracelular, $O_e(t)$, é apresenta na equação V.4.

$$O_e(t) = [Na]_o(t) + [Cl]_o(t) + [C]_o, \quad \text{V.4}$$

onde

$[Na]_o(t)$ e $[Cl]_o(t)$ são os valores de concentração de sódio e cloreto, respectivamente, no instante t e

$[C]_o(t)$ representa o somatório da concentração dos demais ions e compostos orgânicos da solução, correspondendo ao valor 119 mOsmol.

O resultado experimental médio apresentado na figura IV.12 mostra que, durante a perfusão com solução hipertônica, a transmitância máxima ocorreu com o valor estimado da concentração de NaCl em torno de 65 mM. Considerando este valor como o valor próximo do equilíbrio osmótico entre os meios extra e intracelulares, fez-se um novo ajuste para a equação de osmolaridade do meio extracelular. Assim, a expressão normalizada para a osmolaridade extra é apresentada na equação V.5, onde a osmolaridade de equilíbrio de 249 mOsmol foi encontrada substituindo-se o valor 65 para os ions sódio e cloreto na equação de osmolaridade V.4.

$$O_e(t) = \frac{[Na]_o(t) + [Cl]_o(t) + 119}{249} \quad \text{V.5}$$

A osmolaridade do meio intracelular foi estimada considerando-se uma equação de difusão simples. Esta equação possui um termo representativo do coeficiente de difusão total dos solutos e a diferença de osmolaridade entre os meios extra e intracelular. Para representar a diferença de comportamento da transmitância de luz no tecido nas perfusões hipo e hipertônica, faz-se a constante de difusão para meio hipotônico ser maior que aquela do meio hipertônico em um fator aproximado de treze vezes. Assim, a equação da osmolaridade do meio intracelular, $O_i(t)$, é igual a:

$$O_i(t) = O_i(t-1) + \frac{D \cdot D_t \cdot [O_e(t) - O_i(t-1)]}{v(t-1)}, \quad \text{V.6}$$

onde,

D - Coeficiente de difusão total dos solutos. Para perfusão hipertônica o valor empírico utilizado é igual $9 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ e para a perfusão hipotônica, seu valor é igual a $11,8 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s}$;

D_t - Intervalo de interação igual a 1 segundo;

A estimativa da concentração de NaCl foi feita com as equações já descritas no item III.7.1 para a perfusão hipertônica e hipotônica. As equações da estimativa da concentração, em molar, estão repetidas a seguir nas equações V.7 e V.8. Para o caso da perfusão hipertônica tem-se a equação V.7. Para o caso da perfusão hipotônica tem-se a equação V.8.

$$[\text{NaCl}]_o = 0,14 - 0,08 \cdot e^{-\frac{[t(i)-t_{\text{inic}}]}{213}} \quad [\text{M}] \quad \text{V.7}$$

$$[\text{NaCl}]_o = 0,06 + 0,08 \cdot e^{-\frac{[t(i)-t_{\text{inic}}]}{213}} \quad [\text{M}], \quad \text{V.8}$$

onde,

t_{inic} - tempo inicial da perfusão;

$t(i)$ - tempo decorrido na perfusão.

A estimativa da osmolaridade relativa é feita através da razão entre a osmolaridade do meio extracelular e aquela relativa ao meio intracelular. Assim, tem-se a expressão da osmolaridade relativa apresentada na equação V.9. Uma expressão de primeira ordem foi utilizada para fazer a relação entre a osmolaridade relativa, $O_r(t)$, e o índice de refração relativo, $n(t)$. Uma expressão empírica desta relação foi definida pela equação V.10 e foi utilizada na simulação da transmitância de luz.

$$O_r(t) = \frac{O_e(t)}{O_i(t)} \quad \text{V.9}$$

$$n(t) = 0,44O_r(t) + 0,56 \quad \text{V.10}$$

O volume intracelular, $v(t)$, foi estimado através da expressão definida por WEISS (1996) considerando-se que a célula pode variar seu volume, mas sua área de superfície é constante. Esta equação de volume, dependente da osmolaridade relativa, é dada pela equação V.11.

$$v(t) = v(t-1) + 0,02 \cdot D_t \cdot \left[\frac{1}{v(t-1)} - O_r(t) \right] \quad \text{V.11}$$

V.2.2 – DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO ALGORITMO DE SIMULAÇÃO

A figura V.11 apresenta o diagrama esquemático do algoritmo de simulação da transmitância de luz na IPL.

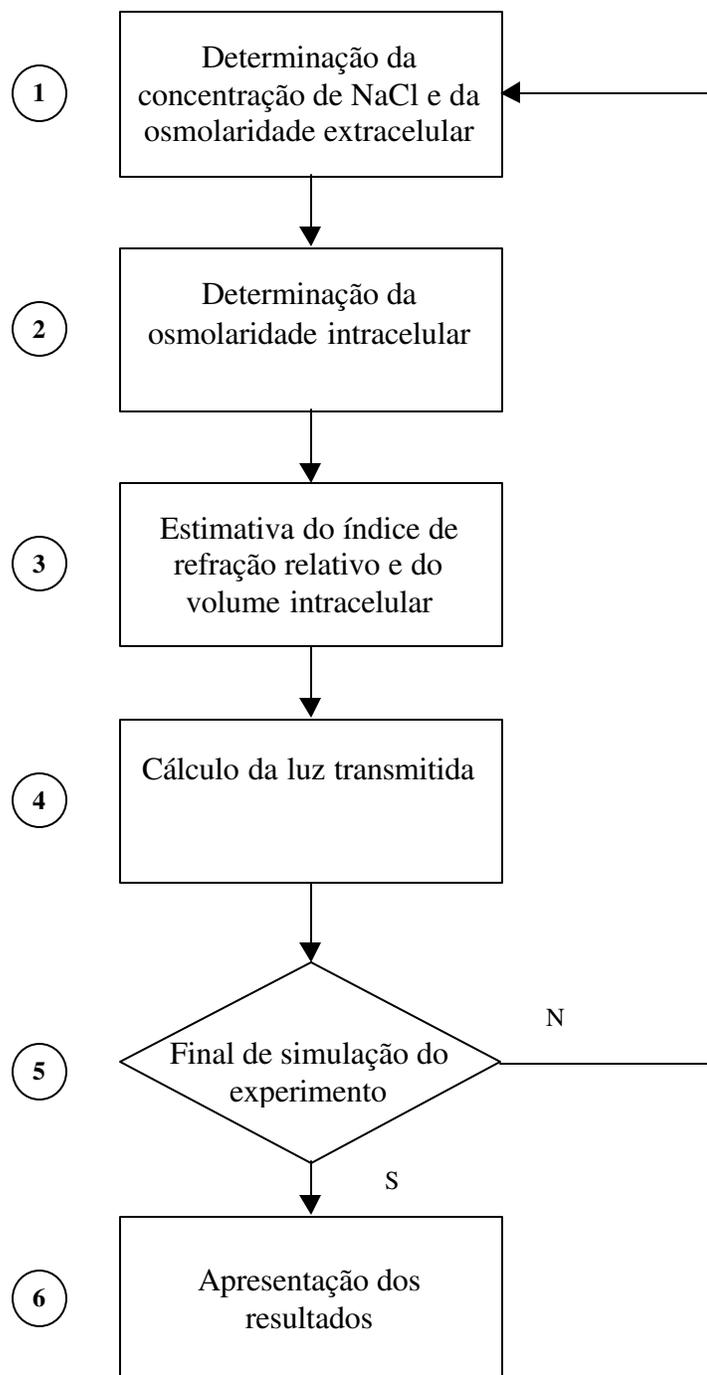
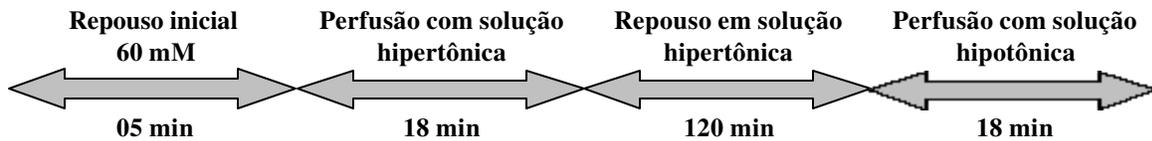


Fig. V.11 – Diagrama esquemático do algoritmo representativo da simulação da luz transmitida na IPL, através de modelagem por uma família de curvas de distribuição normal moduladas por sigmóides. Os blocos de 1 a 6 representam as ações executadas ao longo da simulação

Bloco 1 – Após a inicialização das variáveis associadas aos tempos de perfusão hipotônica, hipertônica e repouso hipertônico, foi feita a estimativa da concentração de NaCl da solução com a utilização da equação V.7 e V.8. Para tanto, considerou-se o tempo total de perfusão feita nos experimentos. O diagrama abaixo sintetiza este procedimento de perfusão ao longo da simulação. Conhecendo-se a concentração de NaCl, foi feita a estimativa da osmolaridade extracelular através da equação V.5.



Bloco 2 – Neste bloco foi feito um teste de verificação do tipo de perfusão. Para solução hipotônica, foi ajustado, na equação V.6, um valor de coeficiente de difusão D igual a $11,8 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s}$. Para o caso da difusão hipertônica, foi ajustado um valor de coeficiente de difusão D igual $9 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$.

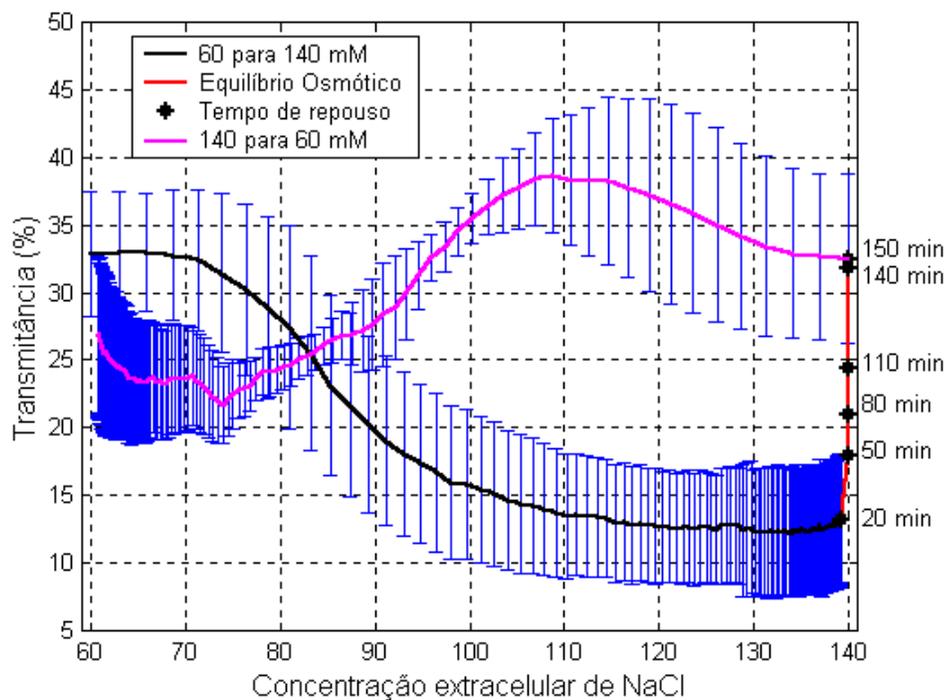
Bloco 3 – Com base na razão entre a osmolaridade extracelular e a intracelular (equação V.9), foi estimado o índice de refração relativo (equação V.10) e volume intracelular (equação V.11).

Bloco 4 – Através das equações V.1, V.2 e V.3, determinou-se a luz transmitida.

Blocos 5 e 6 – Se o final da simulação não ocorreu, o algoritmo vai para a próxima iteração. Ao término da simulação, os resultados foram apresentados em curvas de transmitância em função da concentração extracelular de NaCl.

V.2.3 - RESULTADOS DA SIMULAÇÃO DA TRANSMITÂNCIA

A figura V.12 mostra o resultado de simulação dos experimentos de transmitância de luz em função da osmolaridade variável. Pode-se observar que as considerações para a representação do fenômeno foram suficientes para reproduzir o comportamento da transmitância. Considera-se que estes resultados reforçam a intuição de que a transmitância de luz, durante perfusão hipo e hipertônica, são controladas, predominantemente, pelos índices de refração dos meios extra e intracelulares e pelas características geométricas do espaço extracelular, aqui modulados pela variação do volume intracelular.



Simulação da Transmitância na Retina

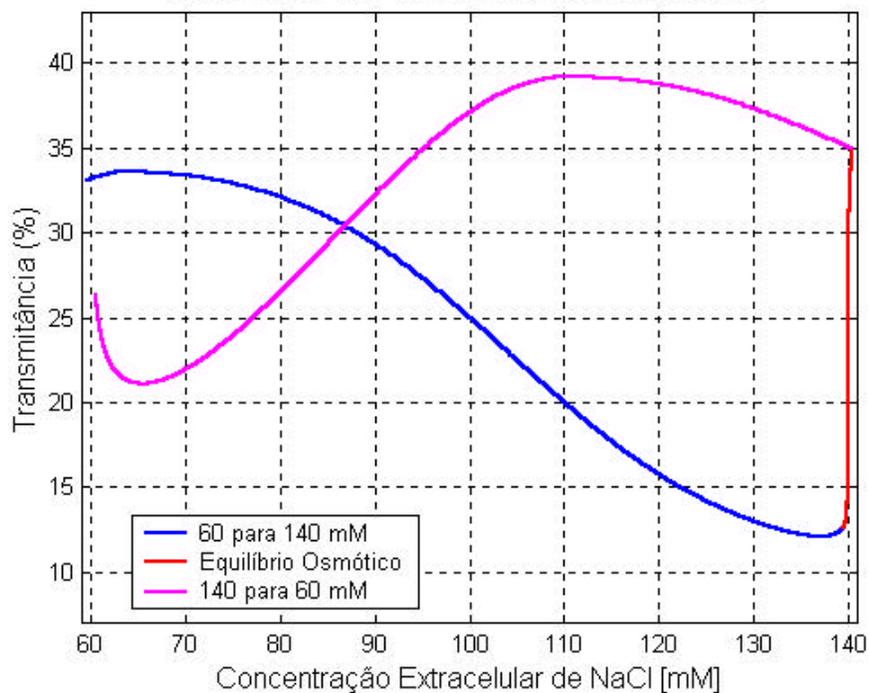


Fig. V.12 - **A** – Reprodução da figura IV.12; **B**- Resultado da simulação da transmitância em função da osmolaridade extracelular variável e variação do volume intracelular. Simulação realizada com perfusão hipertônica, repouso em solução hipertônica e perfusão com solução hipotônica em condições idênticas ao resultado experimental reproduzido em A.

Outro resultado considerado significativo desta simulação foi a distinção apresentada pela luz transmitida nas perfusões hipo e hipertônica. Observa-se, nos resultados experimentais (figura V.12A), que há um aumento da transmitância de luz durante a parte final da perfusão hipotônica. Ao final da perfusão hipertônica não se observa um aumento expressivo da transmitância. Para simular este efeito foi necessário aumentar o coeficiente de difusão global do tecido durante esta perfusão.

Uma possível explicação para esta diferença de comportamento da transmitância, ao final das perfusões feitas, pode se encontrar na seguinte análise. Ao se considerar as concentrações dos sais que compõem a solução nutriente, observa-se que a concentração dos ions sódio e cloreto correspondem a quase 70 % do valor total da osmolaridade. Parece razoável considerar que existem mecanismos de transporte que trabalham de forma diferente em meios hipo e hipertônicos. Parece que estes mecanismos atuam de forma mais lenta, para que o tecido atinja o equilíbrio osmótico, para retirar os ions sódio e cloreto do espaço extracelular em meio hipertônico. Por outro lado, a reposição destes ions para o meio extracelular parece ser feita de forma mais rápida resultando em um aumento da transmitância. Não encontramos na literatura, resultados experimentais, sobre equilíbrio osmótico em retina de ave, que sustentem estas considerações. No entanto, verificamos que mecanismos como bombas de sódio-potássio, bombas de cloreto e mecanismos co-transportadores são sensíveis a oscilações nos níveis de sódio e ou cloreto, além dos mecanismos de difusão simples através da membrana celular.

CAPÍTULO VI - DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

VI.1 - MONTAGEM EXPERIMENTAL

A montagem experimental proposta permitiu reunir, em montagem única, as condições necessárias e suficientes para a realização de experimentos em retina de ave, sendo alguns já descritos na literatura e feitos com montagens específicas. Uma itemização dos tipos de experimentos que podem ser feitos com a montagem experimental é feita a seguir.

Com a presença da onda de DA pode-se registrar:

- o potencial DC do espaço extracelular, que pode ser sincronizado com sinal óptico;
- atividades iônicas com microeletrodos íon-seletivos;
- experimentos com iontoforese;
- sinal óptico intrínseco da onda de DA;
- determinação da velocidade da frente de onda com a utilização do sinal óptico;
- determinação do perfil de potencial e/ou iônico ao longo das camadas da retina;
- avaliação da variação da espessura da retina.

Sem a presença da onda de DA pode-se registrar:

- variação da luz espalhada ou transmitida em função da variação da osmolaridade do meio extracelular;
- variação da espessura da IPL durante variação da osmolaridade extracelular.

Além desta potencialidade da montagem experimental, o procedimento de preparação da retina preserva as características naturais do tecido: não há corte histológico para definição de um plano de observação. O plano em foco é interno ao tecido e permite a visualização simultânea de todas as camadas da retina. Associada a técnicas de processamento de imagens, pode-se determinar a localização da ponta do eletrodo e o espalhamento de luz em qualquer camada da retina.

Adicionalmente, a montagem experimental proposta permite a utilização de iluminação com lâmpada com filamento a tungstênio ou fontes de *laser*. No caso da utilização de fontes de *laser*, as imagens do espalhamento são similares aos registros de imagem com uma iluminação campo escuro. Tal qual esta última, somente a luz espalhada pelo plano em foco do tecido é registrada em um fundo preto. As regiões transparentes do tecido são reveladas na imagem como uma região escura. O contrário é observado para regiões espalhadoras. Se as considerações sobre a similaridade destas configurações são realmente verdadeiras, então pode ser sugerido, a partir dos resultados de HOLTTHOFF e WITTE (1998), que o IOS registrado com o sistema proposto está relacionado com variações do volume do espaço extracelular.

Para verificação das potencialidades da montagem experimental, foram realizados experimentos, com onda de DA, para observar as características do sinal óptico intrínseco e as características de variação da espessura da IPL. Além destes com a presença da onda de DA, foram realizados outros experimentos, sem onda, para análise do sinal óptico apresentado pela retina quando submetida a meios com diferentes valores de osmolaridade.

VI.2 - ONDA DE DEPRESSÃO ALASTRANTE

Apesar da retina apresentar uma transparência natural nas condições da solução nutriente normal, existiu incerteza sobre a posição exata da ponta do microeletrodo de medição de potencial. Apesar desta incerteza, a estratégia foi definir uma janela de amostragem, ao redor da posição mais provável da ponta da pipeta, para a medição do sinal óptico. A janela de amostragem teve como ponto central a coluna mais provável da ponta do microeletrodo evitando-se assim uma superposição na informação espacial do sinal óptico. A evolução espaço temporal do sinal óptico foi resultante do valor médio da intensidade de luz das colunas da janela de amostragem obtida de cada figura digitalizada. O resultado desta técnica foi uma imagem (ETEL) que consegue condensar as informações espaço-temporais de intensidade de luz e variação da espessura da IPL.

A partir da ETEL pôde-se observar o sinal óptico em todas as camadas da retina. A morfologia do sinal óptico na IPL, durante a onda de DA e apresentada neste trabalho, é

consistente com aquela descrita por MARTINS-FERREIRA e OLIVEIRA CASTRO (1966), cujos registros foram feitos em fatias isoladas da retina e com retro-espalhamento. No entanto, além da visualização gráfica, em sistemas de eixos cartesianos, foi possível a visualização espacial da onda de DA, em todas as camadas da retina, em imagem única que pode ser visualizada no plano ou no espaço tridimensional. Os resultados e possibilidades técnicas indicaram que a ETEL constitui-se em uma ferramenta para uma visualização compacta de cada camada do tecido e quantificação das correspondentes variações ópticas ao longo da duração do fenômeno da depressão alastrante.

Associada ao sinal óptico na retina, existe a variação de sua espessura quando da passagem da onda de DA. OLIVEIRA CASTRO e MARTINS-FERREIRA (1970) observaram, durante a passagem da onda de DA, que a retina apresenta uma seqüência de variação de espessura: um decréscimo, de curta duração (em torno de 30 s) e amplitude em torno de $1,5 \mu\text{m}$, seguido de um aumento, de longa duração (15-20 min), no qual o valor máximo ocorre no terceiro minuto a partir do início dessa seqüência. Os autores encontram, para o aumento da espessura, uma amplitude média de $4,8 \pm 1,4 \mu\text{m}$, $p = 0,01$. O resultado apresentado pela ETEL permitiu visualizar esta variação e comprovar que ocorre, principalmente, na IPL, como já descrito na literatura. Verificou-se uma relação entre o sinal óptico e variação da espessura da IPL. No entanto, não foi possível quantificar a variação da espessura da retina com o método proposto. Os resultados, apresentados na ETEL, apontam para uma correlação entre a movimentação mecânica da retina (OLIVEIRA CASTRO e MARTINS-FERREIRA, 1970) e a variação da espessura da IPL vista pelo sinal óptico. As variações na espessura da retina são, provavelmente, resultantes da movimentação de água entre os meios extra e intracelulares durante a onda de DA e que são mais intensas na IPL (OLIVEIRA CASTRO e MARTINS-FERREIRA, 1970).

VI.2.1 - RAZÃO ENTRE OS PICOS MÁXIMOS DO SINAL ÓPTICO

Com base em fotomicrografias, estimou-se que a dimensão média dos terminais sinápticos seja de aproximadamente $1 \mu\text{m}$ (DOWLING, 1979) na IPL da retina de ave. Associada à variação de espessura, durante a onda de DA na retina, existe uma grande

movimentação de íons e água (DO CARMO e MARTINS-FERREIRA, 1984) e, conseqüentemente, existe uma variação do índice de refração relativo. Assim sendo, as dimensões das partículas espalhadoras podem oscilar em torno de valores próximos do comprimento de onda da luz incidente. A óptica geométrica aponta para uma distinção apresentada pelo espalhamento de luz ao comprimento de onda. O retro-espalhamento apresentado pelas partículas é inversamente proporcional à quarta ordem do comprimento de onda. Quanto maior o comprimento de onda menor é o retro-espalhamento apresentado pelas partículas (JOHNSON e GABRIEL, 1981). Se o retro-espalhamento na faixa do vermelho é menor, mais luz atravessa o tecido e a probabilidade de se ter um espalhamento ortogonal aumenta. Analogamente, a luz na faixa do verde apresenta um retro-espalhamento maior e, conseqüentemente, a luz ortogonalmente espalhada diminui. Isto justifica por que o espalhamento ortogonal, medido pela razão entre os picos **b** e **d** (figura IV.9) na faixa do verde ($0,96 \pm 0,09$) é menor que aquele apresentado na faixa do vermelho ($1,16 \pm 0,10$).

OLIVEIRA CASTRO *et al.* (1985) mostraram que o primeiro pico do sinal óptico (**b**) na retina apresenta uma distinção, em sua intensidade, quanto ao comprimento de onda. Medindo retro-espalhamento, eles verificaram que a maior intensidade é obtida com o menor comprimento de onda, no caso, na faixa do azul. Por outro lado, eles verificaram que a resposta óptica correspondente ao segundo pico do sinal óptico (**d**) não mostrou sensibilidade acentuada ao comprimento de onda da luz incidente. Caso os autores tivessem feito a razão entre a intensidade dos picos **b** e **d**, eles teriam encontrado um valor mais elevado para o comprimento de onda na faixa do azul e outro menor para a faixa do vermelho. Para a montagem descrita neste trabalho, os resultados encontrados foram opostos àqueles que seriam obtidos por OLIVEIRA CASTRO *et al.* (1985). Supõe-se, então, que a um aumento da componente retro-espalhada corresponderá uma diminuição do espalhamento ortogonal à luz incidente. Portanto, para o comprimento de onda na faixa do vermelho deverá ser obtida uma razão maior que a verificada na faixa do verde, como comprovam os resultados apresentados na figura IV.9. Desta forma, os resultados apresentados neste trabalho são coerentes com aqueles referentes aos dados experimentais de OLIVEIRA CASTRO *et al.* (1985).

VI.3 - VELOCIDADE DA FRENTE DE ONDA

Como indicado por MARROCOS e MARTINS-FERREIRA (1990), a velocidade da onda de DA é uma notável característica desse fenômeno. Resultados recentes estão de acordo com essa afirmativa como os apresentados por MARTINS-FERREIRA e RIBEIRO (1995). Os resultados da aplicação da técnica proposta para o registro do IOS, associado ao método do PFT para medida da velocidade da onda, como tipicamente mostrado na figura IV.7, sugerem que a aplicação desta metodologia pode ser empregada para o estudo dos mecanismos de propagação da onda de DA. Pôde-se medir a velocidade da onda de DA sem o auxílio de eletrodos de potencial. A montagem proposta possibilitou a medição da velocidade da frente de onda e o resultado de $4,85 \pm 0,81$ mm/min, em sete ondas individuais, foi compatível com aqueles registrados na literatura (MARTINS-FERREIRA, 1993). Este autor relata que as velocidades das ondas individuais estão entre 6 e 10 mm/min, enquanto que as ondas circulantes possuem velocidades de propagação de $3,71 \pm 0,21$ mm/min em solução nutriente normal e temperatura de 30 °C. Com o procedimento proposto neste trabalho, colisões de ondas puderam ser estudadas e algumas hipóteses sobre a propagação de ondas puderam ser reforçadas.

LEÃO (1972) relata uma hipótese de Grafstein para o mecanismo de propagação, segundo o qual a atividade neuronal, que ocorre na frente de onda, causa um grande efluxo do íon potássio para o espaço extracelular suficiente para despolarizar neurônios adjacentes. Esta despolarização causa conseqüentes movimentos iônicos, excitando novos neurônios adjacentes, causando uma propagação desta despolarização para além da região de estímulo. Nestas condições, a velocidade da frente de onda é uniforme. Se a concentração do íon potássio em regiões próximas à frente de onda é aumentada por outra onda, a velocidade da frente de onda deveria aumentar. A figura IV.8A mostra esta situação. Esta figura mostra duas ondas de DA, e o momento de colisão está mostrado em sua parte inferior com uma ilustração com perfil em forma de U, figura IV.8B. O aumento na velocidade pode ser visualizado na figura IV.8C. O ângulo θ é progressivamente aumentado quando as frentes de onda reduzem o espaço entre elas. A variação no valor do ângulo θ , sugerida pelas linhas em branco nas figuras IV.8B e IV.8C, indica um rápido aumento na velocidade da frente de onda. Também a partir da hipótese de Grafstein sobre

os mecanismos de propagação da onda, pode-se interpretar que o aumento na velocidade da frente de onda somente é observado próximo ao momento de colisão porque a ação excitatória do íon potássio acontece para regiões vizinhas à frente de onda.

VI.4 - EXPERIMENTOS COM LUZ TRANSMITIDA E ESPALHADA

Nos experimentos com osmolaridade variável e luz branca incidente foi utilizado um procedimento que fez variar o índice de refração relativo, desde um número menor que a unidade até outro maior. Para esta variação, através de perfusão controlada, a osmolaridade do meio extracelular, associada a mecanismos de transporte transmembrânicos do tecido, variou desde uma condição hipotônica até uma condição hipertônica. A partir da razão entre a osmolaridade extra e a intracelular, presume-se que tenha ocorrido a correspondente transição no índice de refração relativo dentro da faixa pretendida.

Os resultados experimentais da variação contínua da osmolaridade do meio extracelular, tanto no sentido de hipo para hipertônica quanto no sentido inverso, mostraram uma dinâmica da transmitância de luz semelhante a um perfil de histerese relativo ao primeiro quadrante de um sistema de eixos cartesianos. Observou-se a transmitância passando por um valor máximo, no qual o valor do índice de refração relativo provavelmente é igual à unidade, e valores inferiores de transmitância para índices de refração relativos diferentes da unidade. Considerando-se que o valor máximo da transmitância implica em índice de refração relativo igual à unidade, observa-se, pelos resultados, que não há simetria nas dinâmicas de ida e volta nas perfusões realizadas.

Nos experimentos de espalhamento de luz com *laser* incidente, a osmolaridade do meio extracelular foi variada com o mesmo procedimento utilizado nos experimentos com luz transmitida. Os resultados apresentam um perfil um pouco mais complexo que aquele apresentado pela luz transmitida. Os resultados mostraram que a luz ortogonalmente espalhada não é uma componente totalmente complementar da luz transmitida. Um decréscimo da luz transmitida não representa um correspondente aumento na luz ortogonalmente espalhada com um perfil invertido. O aumento do espalhamento, nas partes

finais das perfusões, mostraram esta característica. Ao final da perfusão hipertônica, característica mais salientada com o *laser* vermelho, o decréscimo no espalhamento é mais acentuado que o pequeno aumento na luz transmitida. Por outro lado, ao final da perfusão hipotônica, a razão entre a luz transmitida e espalhada aponta para uma característica proporcional. Esta distinção pode ser um indicativo de que os mecanismos de transporte transmembrânicos envolvidos no processo apresentam comportamentos diferentes para diferentes valores de índice de refração.

O perfil de histerese, visto nos resultados experimentais, pode ser associado ao efeito conjugado das variações do índice de refração e geometria do espaço extracelular sobre o espalhamento de luz. Se o espaço extracelular é reduzido, em decorrência do aumento do espaço intracelular, então a transmitância de luz é favorecida pelo estado lamelar das membranas celulares, o que aumenta sua intensidade. Provavelmente, isto deve ocorrer em meio hipotônico. A luz transmitida nesta direção é maior que aquela em meio hipertônico. Tanto o espalhamento quanto a transmitância apresentaram um perfil de histerese. Contudo, o perfil de histerese apresentado pela luz espalhada é invertido em relação àquele apresentado pela luz transmitida. Os resultados indicam que este perfil de histerese deve estar presente em todas as componentes da luz refratada e também no retro espalhamento.

VI.5 - VARIAÇÃO DA ESPESSURA DA RETINA

Martins-Ferreira e seu grupo analisaram o efeito da variação da osmolaridade nos meios extra e intracelulares sobre o sinal óptico em retina de ave (MARTINS-FERREIRA e OLIVEIRA CASTRO, 1966, OLIVEIRA CASTRO *et al.*, 1985), além da variação de volume durante a passagem da onda de DA (OLIVEIRA CASTRO e MARTINS-FERREIRA, 1970). Eles mostraram que em solução hipertônica, a retina torna-se mais esbranquiçada implicando um aumento na luz refletida. Por outro lado, em solução hipotônica, a retina torna-se mais transparente implicando um decréscimo na luz refletida. VAN HARREVELD e KHATTAB (1967), em córtex de rato, fizeram um estudo sobre a variação do volume do espaço extracelular durante a passagem da onda de DA. LUX *et al.* (1986) fizeram um estudo semelhante sobre as alterações do espaço extracelular e variações

iônicas durante atividade epiléptica, mostrando que o fluxo de água no espaço extracelular é altamente dependente da variação da osmolaridade.

OLIVEIRA CASTRO e MARTINS-FERREIRA (1970) mediram a variação de espessura da retina com um método que utilizava duas esferas perfuradas. Eles descreveram que ao primeiro pico do sinal óptico da onda de DA, pico **b**, estaria associado uma movimentação intensa de ions no meio extracelular e ainda uma redução da espessura da retina relacionada a um aumento da osmolaridade. Eles descreveram também que, ao segundo pico **c**, o sinal óptico estaria associado a mecanismos metabólicos e relacionado com um aumento da espessura da retina devido ao decréscimo da osmolaridade do espaço extracelular.

Diante dos dados experimentais, parece haver uma grande correlação entre alterações da osmolaridade do meio extracelular e a concomitante alteração do espaço extracelular. Esta relação pôde ser qualitativamente observada, e, em alguns casos, também quantificada durante os experimentos desenvolvidos neste trabalho. A movimentação da borda superior da retina pôde ser determinada utilizando-se uma técnica de detecção de borda nas imagens digitalizadas. Esta técnica pôde ser utilizada tanto nos experimentos de luz transmitida (com iluminação com lâmpada com filamento de tungstênio) quanto naqueles de luz espalhada (com iluminação a *laser*). No entanto, esta técnica de detecção de borda não foi eficiente para a determinação da movimentação da borda inferior e superior de uma camada específica. Durante a perfusão de solução hipertônica, em função da pouquíssima luz transmitida ou do excesso de luz espalhada, não foi possível detectar a movimentação da borda inferior da retina.

Além da característica sobre a dinâmica do espalhamento, os experimentos com perfusão hipotônica permitiram a quantificação da variação da espessura da IPL, durante a variação da osmolaridade, em instantes particulares. Em meio hipertônico, mediu-se uma redução da IPL, após equilíbrio osmótico. Em outras palavras, durante a perfusão hipertônica, o espaço intracelular perde água para o espaço extracelular e, provavelmente, o espaço extracelular apresenta uma estrutura mais aleatória entre as interfaces das

membranas não favorecendo a transmitância de luz. Após um período de duas horas, os mecanismos de transporte transmembrânicos fazem com que o índice de refração relativo se aproxime da unidade. Neste ponto, tem-se a luz transmitida em um valor elevado ou onde se tem a luz espalhada em um valor reduzido. As membranas celulares, neste caso, devem se encontrar em uma situação mais lamelar sem aumento na espessura da retina. Os experimentos mostraram que a espessura da IPL é reduzida em meio hipertônico. Por outro lado, pôde-se observar que quanto maior o tempo de exposição da retina a um meio hipotônico, maior será o aumento de sua espessura. Neste caso, provavelmente, o influxo de água para o espaço intracelular aumenta. Observou-se que os resultados experimentais deste trabalho estão, qualitativamente, em acordo com aqueles encontrados na literatura (OLIVEIRA CASTRO e MARTINS-FERREIRA, 1970).

VI.6 - SIMULAÇÃO

VI.6.1 - ÓPTICA GEOMÉTRICA

A simulação, por óptica geométrica, pretendeu analisar a dinâmica do sinal óptico presente na IPL como função de um índice de refração relativo. Considerou-se que um raio ao atravessar as diversas interfaces estava sujeito a desvios definidos pela lei de Snell. A trajetória de um raio foi decomposta, na simulação, em duas componentes: raios refletidos (retro-espalhamento) e refratados. O raio refletido não atravessa o tecido. Ele atinge a superfície de incidência e emerge no mesmo meio de incidência em um determinado ângulo. Os raios refratados, por sua vez, foram decompostos em componentes transmitida, quando o raio atravessa toda a espessura da retina, e espalhada, quando o raio emerge do tecido através de seu invólucro cilíndrico. Os raios que não emergem do tecido são absorvidos.

As simulações indicaram a osmolaridade e geometria como componentes majoritários de modulação do espalhamento no tecido durante variações da osmolaridade dos meios extra e intracelulares. As simulações mostraram que o espalhamento é muito sensível à mudanças no índice de refração relativo, principalmente na região próximo do valor unitário. Pequenas variações em torno deste valor unitário provoca grandes variações

na amplitude do espalhamento. Quando o índice de refração relativo é igual à unidade, a transmitância é máxima e seu valor é independente da geometria entre as membranas no espaço extracelular. Por outro lado, a geometria mostrou ter influência majoritária somente em regiões onde o índice de refração relativo é maior que a unidade. Em outras palavras, a geometria é importante quando o índice de refração do espaço extracelular é maior que o índice de refração do espaço intracelular.

Experimentos descritos na literatura apontam para uma distinção na amplitude do sinal óptico em relação ao comprimento de onda da luz incidente (OLIVEIRA CASTRO *et al.*, 1985). O sinal óptico resultante está relacionado com uma grande movimentação iônica, que, por sua vez, induz movimentação de água entre os meios extra e intracelulares, com conseqüente alteração de volume. Esses resultados indicam que, onde ocorre uma redução rápida de volume, o comprimento de onda da luz incidente passa a ser relevante para a definição da amplitude do sinal óptico. Provavelmente, na frente de onda, tem-se uma predominância da óptica física segundo a qual as dimensões dos corpos espalhadores estão na mesma ordem de grandeza do comprimento de onda da luz incidente.

Se as partículas espalhadoras no tecido são sensíveis às variações da osmolaridade e apresentam variações em sua geometria, então suas dimensões podem oscilar em torno de valores próximos do comprimento de onda da luz incidente. Neste caso, um modelo fundamentado na óptica física deve ser mais eficiente para representar o espalhamento de luz, principalmente sua dependência com o comprimento de onda da luz incidente. É provável que o espalhamento de luz na IPL esteja na fronteira entre a óptica geométrica e a óptica física.

A óptica geométrica possibilitou o estudo sobre a relação entre os índices de refração, geometria e espalhamento de luz. A modelagem geométrica não permitiu o estudo da relação entre comprimento de onda da luz incidente com as dimensões dos corpos espalhadores. Os resultados de simulação permitiram conjeturas sobre como o sinal óptico é afetado pela geometria e pela osmolaridade. Para a verificação da relação do comprimento de onda sobre o sinal óptico, serão necessárias simulações com modelos mais

elaborados, utilizando a óptica física, como aqueles baseados no espalhamento Mie ou Rayleigh. Apesar da limitação da óptica geométrica em distinguir, no espalhamento, a influência do comprimento de onda da luz incidente, as simulações representaram os resultados experimentais em sua dinâmica.

VI.6.2 - LUZ TRANSMITIDA

Para verificar, em uma outra simulação, a influência da geometria e osmolaridade sobre o espalhamento, foi implementado um modelo de transmitância de luz onde estes dois parâmetros modulariam sua dinâmica. Os resultados mostraram que estes dois parâmetros devem ter influência majoritária sobre o espalhamento. Pôde-se verificar as condições nas quais a osmolaridade e a geometria têm efeito predominante sobre o espalhamento de luz. A transmitância de luz, em forma de histerese, obtida ao longo das simulações das perfusões, mostrou uma dinâmica similar aos resultados experimentais correspondentes.

A pressão osmótica, ao final da perfusão, faz com que a osmolaridade intracelular se aproxime da osmolaridade extracelular, fazendo com que o índice de refração relativo se aproxime da unidade. Neste momento, de acordo com as simulações, retorna-se a uma condição de alta transmitância. A transmitância aproxima-se do valor máximo, para um índice de refração relativo próximo da unidade, e é independente da estrutura geométrica do espaço extracelular entre as membranas.

Para obter uma dinâmica similar ao correspondente experimento, principalmente na parte final da perfusão hipotônica, a constante representativa do coeficiente de difusão foi aumentada treze vezes. Isto pode significar que os mecanismos de transporte transmembrânicos, como bombas, transporte mediados por carreadores, canais ativos, entre outros, são mais atuantes em meios hipotônicos. Como a quantidade dos solutos Na^+ e Cl^- constituem algo em torno de 70 % do total dos componentes da solução nutriente, parece razoável considerar que estes mecanismos possam trabalhar de forma diferente em meios hipo ou hipertônicos.

O modelo sugere mais uma vez que a análise da transmitância da luz na retina é uma tarefa complexa. Os resultados indicam que a análise do espalhamento de luz na retina pode ser consequência das variações na osmolaridade e geometria nos meios extra e intracelulares. Os resultados indicam que estas duas componentes influem de forma associada sobre a transmitância de luz na retina. Esta simulação permitiu ainda inferir que os mecanismos de transporte de neurônios e processos gliais podem ter alguma influência sobre o espalhamento de luz, principalmente em meio hipotônico. Neste meio, estes mecanismos mostraram uma distinção favorável ao aumento do espalhamento de luz.

VI.7 - PROPOSTAS DE CONTINUIDADE

A definição de uma montagem experimental geral para o estudo da associação entre a eletroquímica e o sinal óptico durante a onda de depressão alastrante teve como elemento motivador o fato de se tratar de um tema complexo e que ainda se encontra em aberto desde sua primeira observação em 1944. A retina de ave como modelo experimental, utilizada sem corte histológico, se mostrou um tecido de fundamental importância para os estudos propostos. Ela mantém, através de soluções nutrientes adequadas, suas condições fisiológicas, por várias horas, além de permitir a geração de várias ondas consecutivas, virtualmente idênticas, como já salientado por Martins-Ferreira e seu grupo em diversos trabalhos publicados.

Como propostas de continuidade deste trabalho, utilizando-se a montagem experimental desenvolvida, estão programados experimentos e simulações, referentes ao estudo do espalhamento de luz associado a sinais eletrofisiológicos, tais como:

Simulação do espalhamento de luz com óptica física – Com base em registros experimentais da literatura, e com a modelagem da óptica física, como por exemplo o espalhamento Mie e ou espalhamento Rayleigh-Ganz, propõem-se estudar os efeitos do comprimento de onda da luz incidente, da variação da osmolaridade e da geometria sobre o sinal óptico.

Sincronização dos sinais elétricos e óptico - A literatura apresenta registros dos sinais óptico, do potencial elétrico e da variação dos principais íons envolvidos na onda de DA. No entanto, não encontramos, em nossa revisão bibliográfica, nenhuma referência que traga estas informações explicitamente sincronizadas. Acredita-se que, com a utilização da montagem experimental proposta e eletrodos íon seletivos, o estudo da sincronização destes sinais possa trazer mais informações sobre a origem da onda de DA e sua dinâmica em tecidos neurais.

Estudo da Velocidade de Propagação da onda de DA - A literatura descreve alterações na velocidade de propagação da onda de DA em função da composição da solução nutriente. No entanto, não há registro dessas alterações com o equilíbrio osmótico atingido. Propõem-se o estudo da velocidade das ondas de DA, com a técnica de PFT desenvolvida, em soluções nutrientes diferentes da normal e também em diferentes temperaturas. As velocidades serão medidas após o equilíbrio osmótico ter sido atingido.

Comentários Finais

Os resultados obtidos com a montagem proposta neste trabalho, foram compatíveis com a literatura. Os resultados permitiram a assunção de que as variações iônicas, de volume e de potencial no espaço extracelular, durante a passagem da onda de DA e alterações da osmolaridade do meio extracelular, estão interrelacionados com o sinal óptico e que são predominantes na camada plexiforme interna como já descrito em diversas publicações. Estas variações foram sintetizadas e relacionadas de forma a distinguir suas influências no sinal óptico ao longo da passagem da onda de DA. MARTINS-FERREIRA e OLIVEIRA CASTRO (1966) previram o envolvimento da osmolaridade e da geometria com a morfologia do sinal óptico. Os resultados de simulação e experimentais apresentados neste trabalho corroboram tal previsão.

A montagem experimental e os procedimentos de processamento computacional desenvolvidos neste trabalho deram suporte para o estudo do sincronismo entre o potencial extracelular e o sinal óptico na frente de onda de DA. Este estudo gerou uma dissertação de mestrado (SILVA, 2000) e os trabalhos referenciados no Apêndice II. As técnicas propostas

tornam viável a perspectiva de, em trabalhos futuros, estudar-se a sincronização entre os sinais elétrico do espaço extracelular, óptico nas camadas da retina e de concentração iônica, utilizando eletrodos seletivos a ions.

Espera-se que o desenvolvimento desse trabalho e sua continuidade possam contribuir para o esclarecimento de uma série de hipóteses levantadas, por diversos autores, relativas ao sinal óptico na retina de ave, sua origem e associações com a eletroquímica durante a onda de DA em tecidos neurais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREW, R. D., ADAMS, J. R., POLISCHUK, T. M., 1996, "Imaging NMDA- and Kainate-Induced Intrinsic Optical Signals from the Hippocampal Slice", **Journal of Neurophysiology**, v. 76, n. 4, pp. 2707-2717.
- DO CARMO, R. J., MARTINS-FERREIRA, H., 1984, "Spreading Depression of Leão Probed with Ion-Selective Microelectrodes in Isolated Chick Retina", **An. Acad. Brasil. Ciênc.**, v. 56, n. 4, pp. 401-421.
- DO CARMO, R. J., 1987, "Depressão Alastrante", **Ciência Hoje**, vol. 7, n. 37, pp. 26-32.
- DOWLING, J. E., 1979, "Information Processing by Local Circuits: The Vertebrate Retina as a Model System". In: **The Neurosciences, fourth study program**, chapter 10, pp. 163-181, Cambridge, Massachusetts, USA, the MIT Press
- GRAFSTEIN, B., 1956, "Mechanism of Spreading Cortical Depression", **J. Neurophysiol.**, v. 19, pp. 154-171.
- GONZALEZ, R. C., WOODS, R. E., 1993, **Digital Image Processing**, USA, Addison-Wesley Publishing Company.
- GOURAS, P., 1958, "Spreading Depression of activity in Amphibian Retina", **Amer. J. Physiol.**, v. 195, pp. 28-32.
- HOLTHOFF, K., WITTE, O. W., 1996, "Intrinsic Optical Signals in Rat Neocortical Slices Measured with Near-Infrared Dark-Field Microscopy Reveal Changes in Extracellular Space", **Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 8, pp. 2740-2749.

- HOLTHOFF, K., WITTE, O. W., 1997, "Recording of Neuronal Network Properties with Near-Infrared Dark-Field Microscopy and Microelectrodes", **Electrochimica Acta**, v. 42, n. 20-22, pp. 3241-3246.
- HOLTHOFF, K., WITTE, O. W., 1998, "Intrinsic Optical Signals *in vitro*: A Tool to Measure Alterations in Extracellular Space with Two-Dimensional Resolution", **Brain Research Bulletin**, v. 47, n. 6, pp. 649-655.
- JOHNSON, C. S. JR., GABRIEL, D. A., 1981, **Laser Light Scattering**, 1 ed., New York, Dover Publications Inc.
- JOHNSON, L. J., HANLEY, D. F., THAKOR, N. V., 1999, "Optical Light Scatter Imaging of Cellular and Sub-cellular Morphology Changes in Injured Rat Hippocampal Slices", Submitted to **The Journal of Neuroscience Methods**.
- JOHNSTON, D., WU, S. M., 1997, **Foundations of Cellular Neurophysiology**, 3 ed., London, England, A Bradford book.
- KUFFLER, S. W., NICHOLLS, J. G., ORKAND, R. K., 1966, "Physiological Properties of Glial Cells in the Central Nervous System of Amphibia", **J. Neurophysiol.**, v. 29, pp. 768-787.
- LADEWIG, T., HANKE, W., GOLDBERGMANN, M., et al., 1998, "Distribution of Gap Junctions in the Chicken Retina", **Journal of Brain Research**, v. 39, pp. 77-86.
- LEÃO, A. A. P., 1944, "Spreading Depression of Activity in the Cerebral Cortex", **J. Neurophysiol.** v. 7, pp. 331-339.
- LEÃO, A. A. P., MORISON, R. S., 1945, "Propagation of Spreading Cortical Depression", **Journal of Neurophysiology**, v. 8, pp. 33-45.

- LEÃO, A. A. P., 1963, "On the Spread of Spreading Depression", **Brain Function**, University of California Press, v. I, pp. 73-85, *apud* Martins-Ferreira, 1994.
- LUX, H. D., HEINEMANN, U., DIETZEL, I., 1986, "Ionic Changes and Alterations in the Size of the Extracellular Space During Epileptic Activity". In: Delgado-Escueta, A. V. et al. (Editors), **Advances in Neurology**, v. 44, chapter 31, New York, USA, Raven Press.
- MARROCOS, M. A., MARTINS-FERREIRA, H., 1990, "Effect of Na⁺ and Cl⁻ on the Velocity of Propagation of the Spreading Depression in Chick retina", **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, v. 23, pp. 473-476.
- MARTINS-FERREIRA, H., OLIVEIRA CASTRO, G., 1966, "Light-Scattering Changes Accompanying Spreading Depression in Isolated Retina", **Journal of Neurophysiology**, v. 29, pp. 715-726.
- MARTINS-FERREIRA, H., OLIVEIRA CASTRO, G. de STRUCHINER, et al., 1974, "Liberation of Chemical Factors During Spreading Depression in Isolated Retina", **J. Neurophysiol.**, v. 37, pp. 785-791.
- MARTINS-FERREIRA, H., 1983, "Spreading Depression in the Chicken Retina". In: OOKAWA, T. (ed.), **The Brain and Behavior of the Fowl**, Tokyo, Japan, Japan Scientific Societies Press, pp. 317-333.
- MARTINS-FERREIRA, H., 1993, "Propagation of Spreading Depression in Isolated Retina". In: A. LEHMENKÜHLER, K. H. GROTEMEYER, F. TEGTMEIER (eds.), **Migraine: Basic Mechanisms and Treatments**, Urban and Schwartzberg, Munich, Germany, pp. 533-546.
- MARTINS-FERREIRA, H., 1994, "Spreading Depression: a Neurohumoral Reaction", **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, v. 27, pp. 851-863.

- MARTINS-FERREIRA, H., RIBEIRO, L. J. C., 1995, "Biphasic Effects of Gap Junctional Uncoupling Agents on the Propagation of Retinal Spreading Depression", **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, v. 28, pp. 991-994.
- MARTINS-FERREIRA, H., NEDERGAARD, M., NICHOLSON, C., 2000, "Perspectives on Spreading Depression", **Brain Research Reviews**, v. 32, pp. 215-234.
- MÜLLER, M., SOMJEN, G. G., 1999, "Intrinsic Optical Signals in Rat Hippocampal Slices During Hypoxia-Induced Spreading Depression-Like Depolarization", **The American Physiological Society**, pp. 1818-1831.
- NEWMAN, E. A., 1989, "Electrophysiology of Retinal Glial Cells", **Prog. Ret. Res.**, v. 8, pp. 153-171.
- NICHOLSON, C and PHILLIPS, J. M., 1981, "Ion Diffusion Modified by Tortuosity and Volume Fraction in the Extracellular Microenvironment of the Rat Cerebellum", **J. Physiol.**, v. 321, pp. 225-257.
- NICHOLSON, C., 1992, "Quantitative Analysis of Extracellular Space Using the Method of TMA⁺ Iontophoresis and the Issue of TMA⁺ Uptake", **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 70, n. 1, pp. S314-S322.
- OBEIDAT, A. S., ANDREW, R. D., 1998, "Spreading Depression Determines Acute Cellular Damage in the Hippocampal Slice During Oxygen/Glucose Deprivation", **European Journal of Neuroscience**, v. 10, pp. 3451-3461.
- OLIVEIRA CASTRO, G., MARTINS-FERREIRA, H., 1970, "Deformations and Thickness Variations Accompanying Spreading Depression in the Retina", **Journal of Neurophysiology**, v. 33, pp. 891-900.

- OLIVEIRA CASTRO, G. de, MARTINS-FERREIRA, H., GARDINO, P. F., 1985, "Dual Nature of the Peaks of Light Scattered During Spreading Depression in the Chick Retina", **An. Acad. Brasil. Ciênc.**, v. 57, n. 1, pp. 97-103.
- ORKAND, R. K., NICHOLLS, J. G., KUFFLER, S. W., 1966, "The effect of Nerve Impulses on the Membrane Potential of Glial Cells in the Central Nervous System of Amphibia", **J. Neurophysiol.**, v. 29, pp. 788-806.
- POLISCHUK, T. M., ANDREW, R. D., 1996, "Real-time Imaging of Intrinsic Optical Signals During Early Excitotoxicity Evoked by Domoic Acid in the Rat Hippocampal Slice", **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 74, pp. 712-722.
- PURVES, R.D., 1991, **Microelectrode Methods for Intracellular Recording and Ionophoresis**. Academic Press.
- SILVA, S. F., 2000, **Análise de Sincronismo entre o Potencial Extracelular e o Sinal Óptico Intrínseco em Retina de Aves Durante a Depressão Alastrante**. Dissertação de M. Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- SILVA, S. F., ALMEIDA, A. C. G., INFANTOSI, A. F. C., DUARTE, M. A., 2000, "Análise de Sincronismo entre o Potencial Extracelular e o IOS em Retina de Ave Durante Depressão Alastrante". In: **Anais do XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica**, v. 2, pp. 1408-1413, Florianópolis, Set.
- SOMJEN, G. G., AITKEN, P. G., GIACCHINO, J. L., et al., 1986, "Interstitial Ion Concentrations and Paroxysmal Discharge in Hippocampal Formation and Spinal Cord.". In: DELGADO-ESCUETA, A. V. et al. (eds.) , **Advances in Neurology**, v. 44, chapter 33, New York, USA, Raven Press.

- STEPNOSKI, R. A., LAPORTA, A., RACCUIA-BEHLING, F., et al., 1991, "Noninvasive Detection of Changes in Membrane Potential in Cultured Neurons by Light Scattering", **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, pp. 9382-9386
- STREIT, D. S., FERREIRA F^O, C. R., MARTINS-FERREIRA, H., 1995, "Spreading Depression in Isolated Spinal Cord", **Journal of Neurophysiology**, v. 74, n. 2, pp. 888-890.
- VAN HARREVELD, A., KHATTAB, F. I., 1967, "Changes in Cortical Extracellular Space During Spreading Depression Investigated with the Electron Microscope", **J. Neurophysiol.**, v. 30, pp. 911-929.
- VILLRINGER, A., CHANCE, B., 1997, "Non-Invasive Optical Spectroscopy and Imaging of Human Brain Function", **Trends. Neurosci.**, v. 20, pp. 435-442.
- WALZ, W., 2000, "Role of Astrocytes in the Clearance of Excess Extracellular Potassium", **Neurochemistry International**, v. 36, pp. 291-300.
- WEISS, T. F., 1996. **Cellular Biophysics**, 1 ed., v. 1: Transport, Cambridge, Massachusetts, London, England, The MIT Press.

APÊNDICE I - CONCEITOS BÁSICOS

AI.1 - ÓPTICA GEOMÉTRICA

Quando o comprimento de onda da luz incidente em um meio é menor que o tamanho das partículas constituintes deste meio, os fenômenos básicos da óptica podem ser compreendidos sem se levarem em conta os efeitos da interferência e da difração. As definições apresentadas a seguir têm, como base, as definições de JOHNSTON e WU (1997). Assim, tem-se:

Luz

Luz visível compõe uma pequena parte do espectro eletromagnético. Os diversos tipos de ondas eletromagnéticas diferem em seu comprimento de onda e frequência. A figura AI.1 mostra o espectro eletromagnético e a identificação habitual associada aos diversos intervalos de comprimento de onda. Todas as ondas eletromagnéticas propagam no vácuo na mesma velocidade c , relacionada com o comprimento de onda λ e com a frequência f . Dessa forma, estabelece-se a seguinte relação:

$$c = \lambda \cdot f \quad \text{AI.1}$$

onde c é a velocidade da luz e tem o valor de $2,998 \times 10^8$ m/seg.

A velocidade da luz em um determinado material depende de seu comprimento de onda e da natureza do material. Luz visível é tipicamente considerada dentro da faixa de 400-700 nm (figura AI.1). Além de seu comprimento de onda, a luz é caracterizada por sua amplitude, fase, e plano de polarização.

Polarização

Uma onda transversal é aquela cujo deslocamento do meio pela onda é perpendicular à sua direção de propagação. Somente ondas transversas podem ser polarizadas. Luz é uma onda eletromagnética transversa. Existem três vetores

perpendiculares que descrevem a luz: os vetores elétricos e magnéticos, **E** e **B**, e o vetor de deslocamento **S**. Esse vetor está na direção de propagação enquanto **E** e **B** oscilam em ângulos retos a **S** e também entre si. A luz é dita polarizada se **E** oscila de modo particular e é linearmente polarizada se **E** oscila em um plano simples. Tipicamente, uma fonte tal qual uma lâmpada emitirá luz em todos os ângulos de polarização de 0° a 180° . Filtros polarizados deixam passar luz predominantemente em um ângulo particular de polarização.

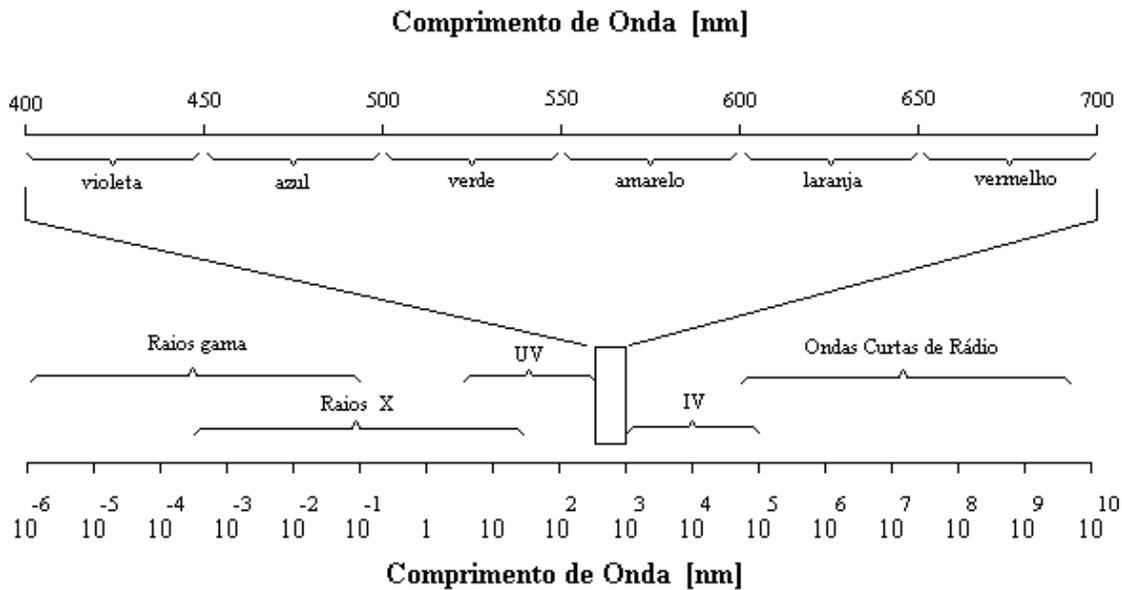


Fig. AI.1 - Espectro Eletromagnético com região de luz visível destacada. (Modificada de JOHNSTON e WU, 1997)

Fase

Ao se considerar a luz como uma onda senoidal, conseqüentemente ela terá uma fase associada. Por exemplo: duas ondas senoidais que estão 180° fora de fase se cancelam mutuamente. Analogamente, dois raios de luz que estão em fase se somam. A luz normalmente contém ondas com vários ângulos de fase.

Reflexão

Uma onda plana reflete-se em uma superfície plana com um ângulo de reflexão igual ao ângulo de incidência. Essa é a lei da reflexão. Esse fenômeno ocorre na fronteira entre dois meios diferentes e, neste caso, uma parte da energia incidente é refletida e outra parte transmitida. A figura AI.2 mostra um raio de luz que atinge uma superfície plana. O

ângulo I entre o raio incidente e a normal à superfície é o ângulo de incidência, e o plano definido entre a normal e o raio de incidência é o plano de incidência. O raio refletido está no plano de incidência e faz um ângulo R_{FL} com a normal.

Refração

O índice de refração de uma substância translúcida é definido como a razão entre a velocidade da luz no vácuo e a velocidade na substância. O índice de refração do ar é unitário. Quando as ondas luminosas que se propagam em um raio incidem sobre uma interface perpendicular ao raio, as ondas entram no segundo meio de refração sem se desviarem de seu curso. O único efeito que ocorre é a redução da velocidade de transmissão e do comprimento de onda. Por outro lado, quando as ondas de luz incidem sobre uma interface em um determinado ângulo, as ondas luminosas se desviam, caso o índice de refração dos dois meios sejam diferentes. Esse desvio se deve ao fato da direção de propagação da luz ser sempre perpendicular ao plano da frente de onda. Assim, um raio de luz muda de direção por que sua velocidade difere nos dois meios. Na figura AI.2, o raio que entra no meio 2 é o raio refratado e o ângulo R_{FR} é o ângulo de refração. Se o raio incidente está em um meio menos denso que o raio refratado, o ângulo de refração será menor que o ângulo de incidência, isto é, o raio refratado se aproxima da normal. Caso o raio incidente está em um meio mais denso que o raio refratado, o ângulo de refração será maior que o ângulo de incidência e o raio refratado se afasta da normal.

A razão entre o seno do ângulo do raio incidente no primeiro meio (I) e o seno do ângulo do raio refratado no segundo meio (R_{FR}) é equivalente à relação entre as velocidades nos meios 1 e 2. Substituindo-se a velocidade em cada meio por sua relação com a velocidade da luz e o respectivo índice de refração chega-se à lei de Snell que é dada por:

$$\frac{\text{sen } I}{\text{sen } R_{FR}} = \frac{v_1}{v_2} = \frac{c/n_1}{c/n_2} = \frac{n_2}{n_1} \quad \text{AI.2}$$

$$n_1 \text{ sen } I = n_2 \text{ sen } R_{FR}$$

onde n_2 é o índice de refração do meio 2 e n_1 é o índice de refração do meio 1.

Considerando dois meios de índices de refração diferentes, sabe-se que as partículas absorvem e re-irradiam luz na mesma frequência. Uma vez que a frequência da luz no segundo meio é igual à da luz incidente, mas a velocidade da onda é diferente, o comprimento da onda da luz transmitida é diferente daquele da luz incidente. Se λ é o comprimento da luz no vácuo, o comprimento de onda λ' da mesma luz em um meio de

índice de refração n é $\lambda' = \frac{v}{f} = \frac{c/n}{f} = \frac{\lambda}{n}$. De outra forma, o índice de refração de um meio

em relação a outro varia com o comprimento de onda do raio de luz incidente. Por esse motivo, o índice de refração de um meio é função do comprimento de onda. Esta dependência entre o índice de refração e o comprimento de onda, e portanto a frequência, é a dispersão.

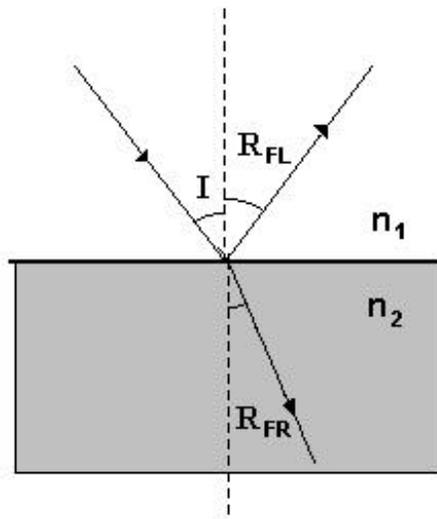


Fig. AI.2 - Reflexão e Refração da luz em meios com índices de refração diferentes. I = raio incidente, e R = raios refletidos ou refratados. (Modificada de JOHNSTON e WU, 1997)

Dispersão

A variação da velocidade de propagação com o comprimento de onda é denominada dispersão. A figura AI.3 mostra a variação do índice de refração com o comprimento de onda. Deve-se observar que o índice de refração é maior para comprimentos de onda menores. Nesta figura, um raio de luz policromático, constituído de ondas de comprimentos diversos, incide em uma face de um prisma. Como o desvio produzido pelo prisma aumenta o índice de refração, a luz visível violeta (v) sofrerá desvio maior que a de qualquer outra

cor; a luz vermelha (r) será a de menor desvio. A diferença entre os ângulos de desvio de dois raios quaisquer ou cores é denominada dispersão angular desses raios.

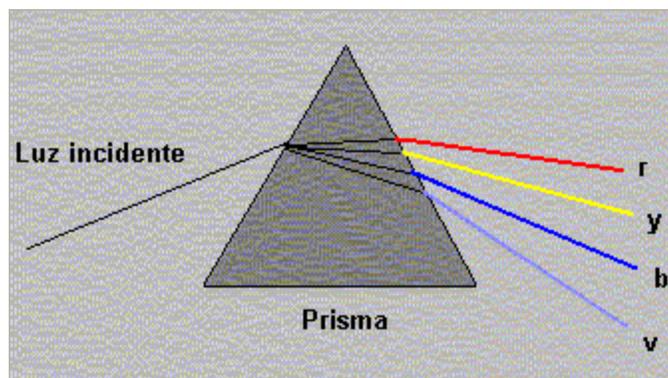


Fig.AI.3 - Dispersão da luz em um prisma em função do comprimento de onda da luz incidente.

AI.2 - TRATAMENTO DE IMAGENS

O principal objetivo da aplicação das técnicas de tratamento de imagens é processá-las de modo que o resultado seja mais satisfatório que a imagem original para uma aplicação específica. Em função da natureza das imagens, pode-se utilizar técnicas diferentes. Isso significa que uma técnica aplicada pode produzir resultados muito bons para uma situação específica, mas a mesma técnica aplicada a outra situação pode produzir péssimos resultados.

Os métodos de tratamento de imagem podem ser classificados em duas categorias (GONZALEZ e WOODS, 1993): métodos de domínio espacial e métodos para o domínio da frequência. Neste trabalho, empregam-se técnicas de domínio espacial. Os métodos de domínio espacial referem-se ao tratamento no próprio plano da imagem, e a abordagem nessa categoria está baseada na manipulação direta dos *pixels* da imagem. Técnicas de processamento no domínio da frequência estão baseadas na modificação da transformada de Fourier de uma imagem.

Métodos para Domínio Espacial

O termo domínio espacial refere-se ao conjunto de *pixels* que compõem uma imagem, e métodos para domínio espacial são procedimentos que operam diretamente

nesses *pixels*. Funções para processamento de imagem no domínio espacial podem ser descritas pela expressão:

$$g(x, y) = T[f(x, y)], \quad \text{AI.3}$$

onde $f(x,y)$ é a imagem original, $g(x,y)$ é a imagem processada, e T é um operador sobre (f) , definido sobre alguma vizinhança de (x,y) .

A utilização de máscaras espaciais para processamento de imagem, usualmente, são denominadas de filtragens espaciais. Portanto, as máscaras são denominadas de filtros espaciais.

Filtros Passa baixas

Atenuam ou eliminam somente os componentes de alta frequência no domínio de Fourier. Componentes de alta frequência caracterizam-se por bordas ou outros detalhes de forma em uma imagem. Assim, o efeito líquido da filtragem passa baixa é uma imagem enevoada (homogênea).

Uma das principais dificuldades do método de alisamento dos filtros passa baixas é que ele homogeneiza bordas e outros detalhes de borda. Se o objetivo é a redução de ruídos sem homogeneizá-los, uma alternativa é utilizar filtros medianos. Esse tipo de filtro substitui o nível de cinza de cada *pixel* pela mediana dos níveis de cinza da vizinhança daquele *pixel* ao invés da média usualmente empregada. Essa técnica é particularmente efetiva quando o ruído é caracterizado por fortes componentes agudas e a característica a ser preservada é a clareza das bordas.

Filtros Passa altas

A utilização desses filtros em uma imagem resulta na atenuação ou eliminação dos componentes de baixa frequência no domínio de Fourier. Como os componentes de baixa frequência são responsáveis pelas características de variação lenta de uma imagem, tais como contraste total e intensidade média, o resultado líquido da filtragem passa alta é a redução dessas características e o correspondente aparecimento das bordas de contorno e outros detalhes de forma.

AI.3 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GONZALEZ, R. C., WOODS, R. E., 1993, **Digital Image Processing**, USA, Addison-Wesley Publishing Company.

JOHNSTON, D., WU, S. M., 1997, **Foundations of Cellular Neurophysiology**, 3 ed., London, England, A Bradford book.

APÊNDICE II - TRABALHOS PUBLICADOS

AII.1 – TRABALHOS COMPLETOS PUBLICADO EM EVENTOS NACIONAIS

DUARTE, M. A., BASSANI, J. W. M., ALMEIDA, A. C. G., 2000, “Sinal Óptico Intrínseco na Retina: Uma Técnica de Medição de Espalhamento de Luz”. In: **Anais do XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica**, v. 2, pp. 872-877, Florianópolis, Set.

SILVA, S. F., ALMEIDA, A. C. G., INFANTOSI, A. F. C., DUARTE, M. A., 2000, “Análise de Sincronismo entre o Potencial Extracelular e o IOS em Retina de Ave Durante Depressão Alastrante”. In: **Anais do XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica**, v. 2, pp. 1408-1413, Florianópolis, Set.

AII.2 – TRABALHOS COMPLETOS PUBLICADO EM EVENTOS INTERNACIONAIS

DUARTE, M. A., BASSANI, J. W. M., ALMEIDA, A. C. G., 2000, “Functional Imaging of the Retinal Layers by Laser Scattering: An Approach for Study of Spreading Depression in Intact Tissue”. In: **Annals of World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering Conference Proceedings**, CD, Chicago, Set.

AII.3 – TRABALHOS EM FASE FINAL DE REDAÇÃO

DUARTE, M. A., ALMEIDA, A. C. G., BASSANI, J. W. M., 2001, “An Approach for Study of Spreading Depression in Intact Tissue by Laser Scattering”. To be Submitted to **Journal of Neuroscience Methods**.

DUARTE, M. A., ALMEIDA, A. C. G., RODRIGUES, A. M., CARVALHO, R. S., BASSANI, J. W. M., 2001, “Optical Changes in Chicken retina during Osmolarity Variation of Extracellular Space”. To be Submitted to **Journal of Neuroscience Methods**.