

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA ELÉTRICA E DE COMPUTAÇÃO

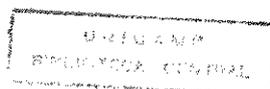
A Depressão Alastrante na Retina

Este exemplar corresponde à redação final da tese
defendida por Nathalia L. V. Peixoto
e aprovada pela Comissão
Juizadora em: 28 / 02 / 97

Orientador

Autora : Nathalia Lopes Vieira Peixoto

Orientadora: Profa.Dra. Vera Maura Fernandes de Lima



2207016

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
T/Unicamp	
0359 d	
V. Ex.	
TOMBO B/	30748
PROD.	281197
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	13/06/97
N.º CPD	

CM-00098468-8

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

A Depressão Alastrante na Retina

Autora: Nathalia Lopes Vieira Peixoto ✉

Orientadora: Profa.Dra. Vera Maura Fernandes de Lima ✉

Curso: Engenharia Elétrica.

Área de concentração: **Automação**

Dissertação de Mestrado apresentada à comissão de Pós Graduação da Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Elétrica.

Campinas, 1997

S.P. - Brasil

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

P359d

Peixoto, Nathalia Lopes Vieira

A depressão alastrante na retina / Nathalia Lopes
Vieira Peixoto. --Campinas, SP: [s.n.], 1997.

Orientadora: Vera Maura Fernandes de Lima.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Elétrica e de
Computação.

1. Retina. 2. Enxaqueca. 3. Equações diferenciais
parciais. 4. Autômato celular. I. Lima, Vera Maura
Fernandes de. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação. III.
Título.

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

Dissertação de Mestrado

A Depressão Alastrante na Retina

Autora: Nathalia Lopes Vieira Peixoto

Orientadora: Profa.Dra. Vera Maura Fernandes de Lima

Profa.Dra. Vera Maura Fernandes de Lima, Presidente
FEEC, UNICAMP

Prof. Dr. Alberto Cliquet Jr.
FEEC, UNICAMP

Prof. Dr. Wolfgang Hanke
Univ. Hohenheim, Stuttgart, Alemanha

Campinas, 28 de fevereiro de 1997

Agradecimentos

Agradeço o apoio financeiro das seguintes instituições, que possibilitaram a realização deste trabalho: FAPESP, pela bolsa de mestrado (projeto 95/07337-0), DAAD e CAPES, pelo financiamento das viagens à Alemanha, e ao Instituto de Zoofisiologia da Universidade de Hohenheim (Alemanha), pelo apoio durante minha visita acadêmica.

Peço humildes desculpas aos pintinhos sacrificados em nome do conhecimento científico, ainda que se suspeite que o ganho epistemológico possa não superar a perda em vidas.

Agradeço aos professores Vera Maura Fernandes de Lima e Wolfgang Hanke, pela proposta do tema e discussões durante o desenvolvimento do trabalho, e ao grupo de colaboradores do professor Wolfgang Hanke, em particular a Meike Wiedemann e Sabine Brand, pelo auxílio durante os experimentos. Ao amigo e colega Markus Dahlem, pelas estimulantes conversas *über Gott und die Welt*.

Sou especialmente grata a meus pais, Maria da Glória e Estanislau, e ao meu irmão, Guilherme, que sempre me apoiaram até quando não concordavam comigo, pelo interesse em meu trabalho de mestrado.

Quero agradecer também ao meu querido companheiro, Walter, pelas inúmeras discussões sobre os aspectos matemáticos do trabalho, por ter ouvido infundáveis repetições das apresentações orais sobre a depressão alastrante, por ter sempre criticado tudo, construtivamente, e por ter me ensinado a ver o mundo de uma forma mais leve.

Dedico este trabalho à minha irmã, Luciana (*in memoriam*), que me incentivou a continuar o trabalho fora do Brasil no momento em que ela mais necessitava da minha companhia.

RESUMO

Apresentamos neste trabalho um estudo sobre o fenômeno da depressão alastrante na retina *in vitro* de pintainho. O enfoque experimental investiga a relação espaço-temporal entre dois dos concomitantes das ondas de depressão alastrante: a alteração lenta de potencial e o sinal intrínseco óptico. Além disso, avalia-se o efeito de manipulações fármaco-químicas sobre estes dois concomitantes. Do ponto de vista teórico, propomos duas formas matemáticas diversas de interpretar a depressão alastrante, uma delas baseada na teoria de autômatos celulares e a outra em equações de reação-difusão. Implementamos dois modelos computacionais a partir destas interpretações, e discutimos sua aplicabilidade e seu poder de simulação do fenômeno biológico.

ABSTRACT

This work presents an investigation of the phenomenon of the spreading depression in the *in vitro* chicken retina. The experimental approach deals with the space-time relationship between two of the spreading depression wave concomitants: the slow shift potential and the intrinsic optical signal. Chemical manipulations on the perfusing solution are performed and their effect on the two concomitants analyzed. Under the theoretical point of view, we propose two different mathematical interpretations to describe the spreading depression. One of them is based on the theory of cellular automata, and the other on the reaction-diffusion equations. We implement two computational models and discuss their applicability and their capacity to simulate the biological phenomenon.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
1. DEPRESSÃO ALASTRANTE: CONCEITUAÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
1.1. HISTÓRICO E DESCRIÇÃO DO FENÔMENO	3
1.2. FENÔMENOS CONCOMITANTES	5
1.3. SISTEMAS RELACIONADOS	9
2. MODELOS ANALÍTICOS E SINTÉTICOS	12
2.1. AUTÔMATOS CELULARES: ENFOQUE ANALÍTICO	12
2.2. MEIOS EXCITÁVEIS: ENFOQUE SINTÉTICO	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1. PREPARAÇÕES BIOLÓGICAS E REGISTROS	25
3.1.1. ANIMAIS	25
3.1.2. EQUIPAMENTOS E PRODUTOS QUÍMICOS	25
3.1.3. REGISTRO ELETRO-FISIOLOGICO	26
3.1.4. REGISTRO ÓPTICO	27
3.1.5. PROCEDIMENTOS	27
3.2. RECURSOS COMPUTACIONAIS	29
3.2.1. ANÁLISE DE DADOS	29
3.2.2. IMPLEMENTAÇÃO DOS MODELOS	32
4. RESULTADOS EXPERIMENTAIS E COMPUTACIONAIS	34
4.1. RESULTADOS EXPERIMENTAIS	34
4.1.1. BARBITÚRICO	38
4.1.2. BÁRIO	40
4.1.3. GLICEROL	42
4.1.4. PROPANOL	44
4.1.5. PROPRANOLOL	46
4.1.6. CLORETO DE SÓDIO	48
4.2. AUTÔMATOS CELULARES	50
4.2.1. DESCRIÇÃO DO MODELO IMPLEMENTADO	50
4.2.2. TESTE DE VALIDAÇÃO E SIMULAÇÕES	52
4.3. MEIOS EXCITÁVEIS E EQUAÇÕES DE REAÇÃO-DIFUSÃO	56
4.3.1. IMPLEMENTAÇÃO DO MODELO	56
4.3.2. TESTE DE VALIDAÇÃO E SIMULAÇÕES	58

5. DISCUSSÃO	64
6. CONCLUSÕES	70
6.1. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	70
7. BIBLIOGRAFIA	72
LISTA DE ABREVIATURAS	80
APÊNDICES	81

Introdução

Existirmos: a que será que se destina?
(Caetano Veloso, em "Capuina")

Ondas de depressão alastrante (DA) vêm sendo estudadas na retina há quase quarenta anos. Entretanto, uma descrição detalhada da relação espaço-temporal entre o sinal eletrofisiológico clássico (queda no potencial extra-celular) e a mudança das propriedades ópticas do tecido (sinal intrínseco óptico) ainda faltava na literatura. A explicação para esta ausência é simples: a introdução da vídeo-microscopia e do processamento digital da imagem na depressão alastrante da retina é bem recente. O primeiro laboratório dedicado ao processamento de imagem funcional neste modelo experimental foi inaugurado em 1993, na Universidade de Hohenheim (Alemanha).

A primeira parte deste trabalho relata os resultados de experimentos que examinam as relações entre os sinais ópticos e eletro-fisiológicos adquiridos simultaneamente e a resposta de ambos a diversas manipulações da solução de perfusão. Na segunda parte do trabalho um modelo mecanicístico para explicar a gênese e propagação destas ondas é testado através da proposta e implementação de dois modelos computacionais.

Quanto à organização do texto, o capítulo 1 resume a evolução histórica da pesquisa das ondas de DA e descreve os fenômenos concomitantes à passagem da onda.

Os dois enfoques teóricos são apresentados no capítulo 2. Um deles baseia-se na descrição da propagação da onda pela retina utilizando a teoria dos autômatos celulares, e por isso pode ser considerado como do tipo analítico (*top-down*). O segundo modelo, chamado de sintético (*bottom-up*), baseia-se na elaboração de uma interpretação do fenômeno como resultado da excitabilidade do meio, e engloba a proposta de funções para o modelamento de mecanismos celulares e de membrana.

O capítulo 3 expõe os procedimentos experimentais adotados, incluindo a descrição da preparação biológica e os recursos computacionais utilizados no processamento de imagens e na implementação dos modelos. Além disso, esclarece os métodos estatísticos aplicados na análise dos resultados.

O capítulo 4 é dedicado à apresentação detalhada dos resultados experimentais e computacionais obtidos. No capítulo 5 discutimos os resultados apresentados no capítulo anterior, comparando-os com dados da literatura e analisando alguns aspectos relevantes para a explicação do fenômeno da DA da maneira proposta no capítulo 1. Além disso relacionamos alguns dos resultados computacionais com resultados experimentais. Mostramos também a importância dos dois modelos sob o ponto de vista de reprodução da forma geométrica e dos processos intrínsecos à ocorrência das ondas de DA, além da previsão de comportamentos a partir de condições de contorno ou situações ainda não testadas experimentalmente.

O capítulo 6 é reservado às conclusões e ao levantamento de questões relevantes à compreensão do fenômeno da DA enquanto resultado de interações eletro-químicas. Neste capítulo propomos também um elenco de sugestões para trabalhos futuros.

Esta dissertação inclui ainda quatro apêndices com listagens de programas, estruturas moleculares de alguns produtos fármaco-químicos utilizados, e tabelas e gráficos relativos ao tratamento estatístico que fundamenta os resultados apresentados.

Com relação ao estilo, a bibliografia e as citações seguem as normas da ABNT (NBR 10520/1988). Optamos, contrariamente à nossa pretensão inicial, por manter certos termos em inglês, tais como *top-down*, *bottom-up off-set*, *buffer*, *setup*, *pixel*, *gap-junctions*, etc. por acreditarmos que estas expressões já possuem um significado técnico preciso.

1. Depressão alastrante: conceituação e revisão bibliográfica

Neste capítulo apresentamos o histórico da depressão alastrante (DA), incluindo a sua relação com a síndrome da enxaqueca clássica e a descrição dos vários fenômenos concomitantes a ela. Discutimos também a sua comparação com sistemas em química, física e biologia que apresentam comportamentos semelhantes à DA.

1.1. Histórico e descrição do fenômeno

Em 1931, o psicólogo e anatomista K.S.Lashley publica um estudo sobre o córtex visual tentando mostrar a noção de descentralização da função cerebral, contrária à localização anatômica absoluta, que era a idéia predominante na época. O modelo de integração cortical proposto apresenta, como propriedade emergente, ondas de excitação através de todo o tecido estudado (Lashley, 1931). Dez anos depois, tendo crises de enxaqueca praticamente todos os dias, Lashley publica um estudo do seu próprio caso de enxaqueca, ou, mais especificamente, de um dos sinais da síndrome da enxaqueca clássica, os escotomas visuais viajantes (Lashley, 1941), que usualmente ocorrem na fase inicial do ataque, e precedem a dor de cabeça propriamente dita (Sacks, 1992). A figura 1.1 mostra a evolução dos escotomas na forma vista por Lashley, que associou o seu brilho à fase de excitação e a cegueira transiente após a passagem do escotoma a uma fase de inibição total. Fazendo a projeção retinotópica no córtex visual primário, a velocidade encontrada por ele foi de 3 mm/min.

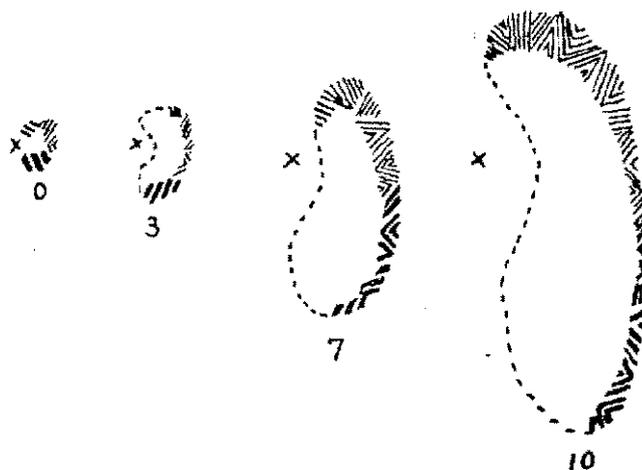


Figura 1.1 - A evolução dos escotomas cintilantes no tempo, desenhados por Lashley (1941). As marcas "x" indicam o ponto de fixação. Os números são dados em minutos.

Sem conhecimento dos trabalhos de Lashley, o estudante de doutorado Aristides Leão, ao fazer experimentos sobre a propagação da atividade epiléptica em coelhos, verifica a depressão da atividade elétrica espontânea do córtex. Utilizando vários eletrodos, mede a velocidade com que tal depressão se espalha pelo tecido cerebral, obtendo o valor de 3mm/min. Em 1944 Leão escreve sobre o fenômeno eletrofisiológico descoberto, e o chama de depressão alastrante (DA) cortical. As suas principais características eram, então, a alteração lenta do potencial DC cortical durante a passagem da onda e a simultânea depressão reversível das oscilações de voltagem espontâneas do tecido cortical (Leão, 1944a e b).

Em 1958 as descrições dos escotomas viajantes de Lashley são associadas ao fenômeno da DA, por Milner (1958). Uma das hipóteses mais elegantes a respeito da significância da DA foi proposta por Bureš (Bureš et al., 1984), em 1984. Admitindo a relação entre a DA e a enxaqueca, ele afirma que a ocorrência das ondas é o resultado da excessiva densidade de neurônios, ou seja, na espécie humana há uma densidade de células tão alta que eventualmente acontece uma volta ao estado inicial no sistema. Apesar de até hoje haver controvérsias sobre a associação entre a aura visual da enxaqueca e a depressão alastrante, medidas eletroencefalográficas de potencial (na faixa de 1 a 3Hz) em pacientes durante a fase dos escotomas mostram a existência de ondas do tipo da DA (Sacks, 1992).

Também em 1958, quando a DA já havia sido verificada em várias outras espécies animais (Leão, 1947 e Marshall, 1950), o mesmo fenômeno é identificado na retina, parte mais acessível da matéria cinzenta central dos vertebrados (Gouras, 1958), e desde então tem sido estudada em retinas de anfíbios, mamíferos, aves e peixes (Hanawa et al., 1967, Hanawa et al., 1968 e Tomita, 1984). A figura 1.2 apresenta seis fotos da retina de pintinho vista de cima, sendo que na primeira nota-se o ponto de estimulação quase no centro. Nos quadros seguintes a onda óptica, chamada de sinal óptico intrínseco (IOS), se propaga através de todo o tecido. Na última foto a retina está novamente no estado quiescente. O sinal óptico também pode ser observado em outras áreas da matéria cinzenta, mas com magnitude muito menor. O interesse na retina como modelo experimental pode ser explicado pela facilidade de visualização da propagação da onda. Este modelo foi desenvolvido principalmente por Martins-Ferreira (Castro e Martins-Ferreira, 1970, Martins-Ferreira, 1983, doCarmo e Martins-Ferreira, 1984), que em 1974 propõe a onda circulante, um tipo de preparação em que se tem um anel de retina através do qual uma onda pode propagar por várias horas (Martins-Ferreira et al., 1974). Um

outro tipo de onda observada na retina é a espiral (figura 1.3), que foi obtida por Bureš (Gorelova e Bureš, 1983) a partir de uma previsão da teoria de ondas em meio excitável.

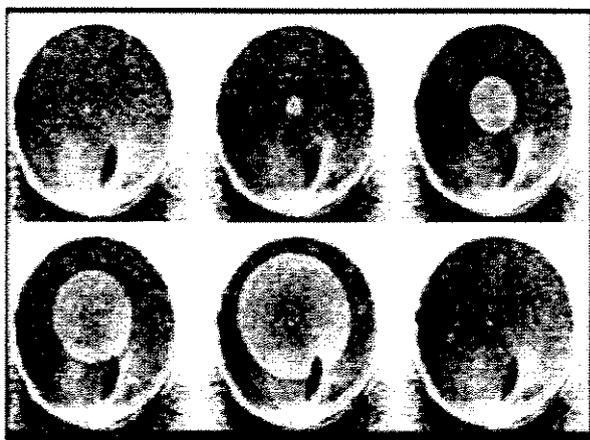


Figura 1.2 - A onda de depressão alastrante na retina de pintinho - sinal intrínseco óptico (IOS).
Modificado de doCarmo (1992).

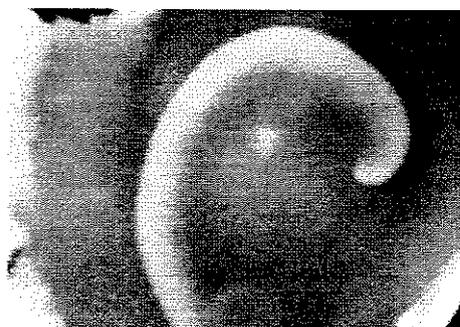


Figura 1.3 - A onda espiral na retina, de Dahlem (1994).

Na década de 70, com a utilização de eletrodos sensíveis a ions, são investigados outros tipos de alterações concomitantes às ondas de DA, além do IOS e da onda lenta de potencial (Vyskocil et al., 1972, Nicholson e Kraig, 1981, Purves, 1981). Além disso, são feitas medidas intra-celulares também durante a ocorrência da DA (Sugaya et al., 1975). Em 1994 a técnica de *patch-clamp* é utilizada para o estudo da DA (Hanke et al., 1993).

1.2. Fenômenos concomitantes

A retina dos vertebrados constitui um tecido transparente (Moses, 1981), onde os movimentos iônicos que ocorrem durante a passagem da onda têm como uma das conseqüências a alteração do volume relativo entre os espaços extra-celular e intra-celulares das populações de neurônios e células de Müller, fazendo com que a luz seja refletida, e a onda seja vista como mostra a figura 1.2. As retinas de galinha são mais adequadas como modelo

experimental para o estudo da depressão alastrante devido à sua avascularidade, facilitando a manutenção quando isoladas (*in vitro*). Nas figuras 1.5 e 1.6 são mostrados o perfil da onda de potencial e movimentação iônica entre os espaços intra e extra-celular associados à depressão alastrante.

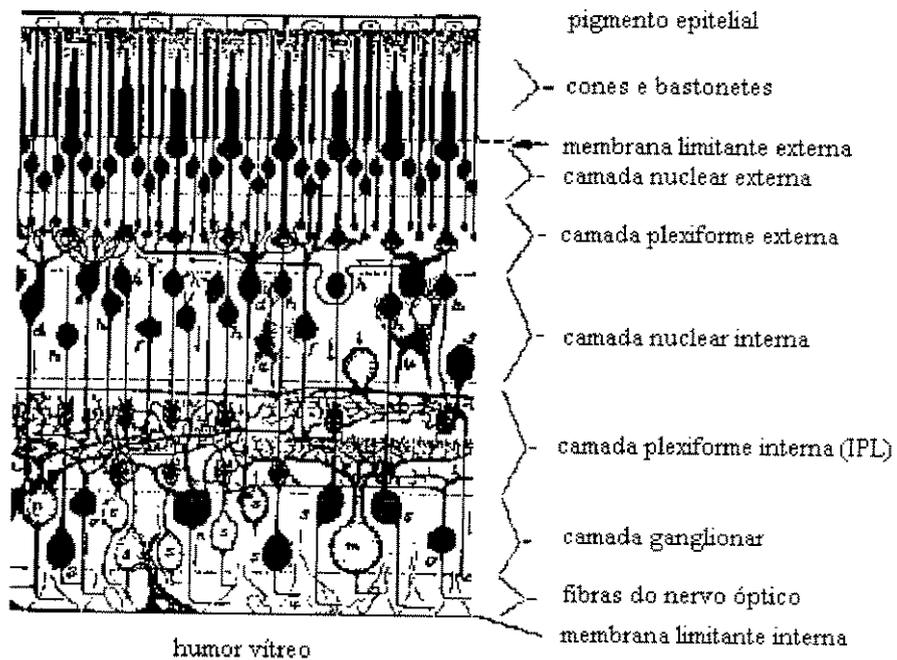


Figura 1.4 - As camadas da retina. modificado de Ruch-Patton (1965).

A estrutura laminar das várias camadas da retina, comum a todas as espécies (Dowling, 1987), simplifica a análise dos fenômenos que ocorrem durante a DA. Em particular, na camada plexiforme interna (IPL) encontram-se apenas terminações sinápticas e processos das células de Müller. A figura 1.4 apresenta esquematicamente um corte transversal da retina, onde se pode observar a denominação das camadas e os tipos de células presentes em cada uma delas. A cada uma destas camadas pode-se associar um sinal eletro-fisiológico durante a propagação das ondas de DA, como mostra o perfil da figura 1.5. As maiores amplitudes obtidas são da ordem de 20mV, e correspondem à IPL. Nesta camada são feitas também as medidas das alterações iônicas, como se observa na figura 1.6.

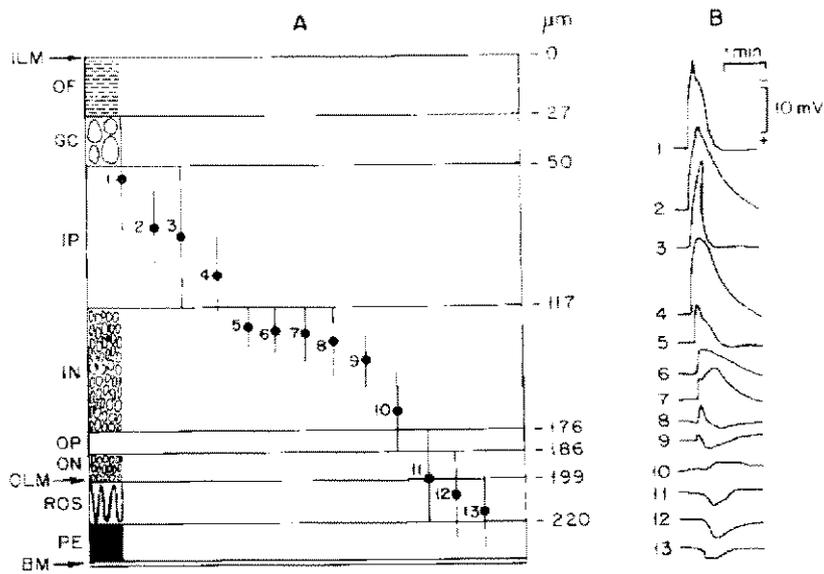


Figura 1.5 - Perfil da depressão alastrante na retina. modificado de do Carmo e Martins-Ferreira (1984).

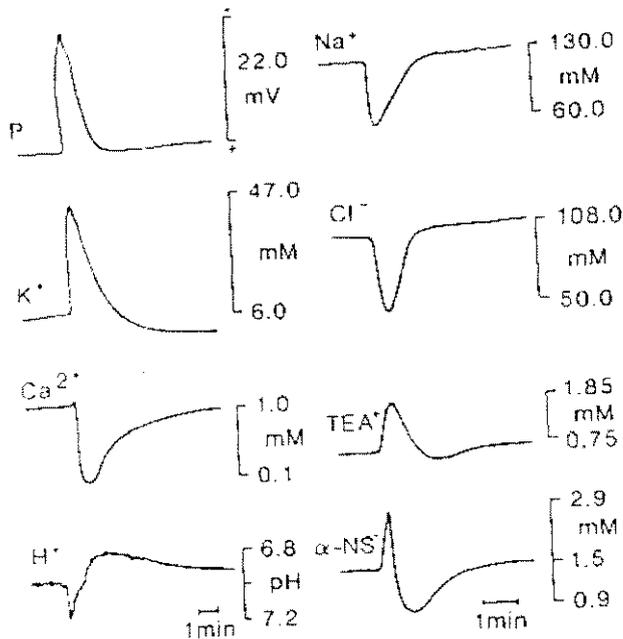


Figura 1.6 - Medidas das alterações iônicas durante a DA, no meio extra-celular (IPL), de Martins-Ferreira e do Carmo (1987).

A DA pode ser explicada como uma seqüência de eventos metabólicos e eletrofisiológicos que interagem de forma complexa, localmente, disparando o comportamento global medido em qualquer parte da matéria cinzenta central. A nível celular, inúmeros fenômenos ocorrem de forma concomitante durante a DA (Bureš et al., 1984, Gardner-Medwin, 1983). Não há, até hoje, um mapeamento exato sobre o que acontece na propagação

da onda, mas sim uma “proto-teoria”, que mostramos esquematicamente na figura 1.7 e descrevemos a seguir. De forma simplificada, pode-se dizer que o aumento da concentração de potássio no meio extra-celular acima de um nível máximo (chamado de *ceiling level*), usualmente estimado em 10mM, acelera o processo de liberação de transmissores e saída de potássio dos terminais sinápticos. Primeiramente temos então a entrada de sódio nos terminais sinápticos, dando início a um processo auto-catalítico de liberação de potássio, através do aumento da condutância dos canais de potássio. Dependendo da magnitude do processo, as células gliais (de Müller), vistas aqui como controladoras e reservatório de potássio (Grossman, 1977), não conseguem manter (através da aceleração das bombas de Na-K) a diferença de concentração de K^+ entre os meios intra e extra-celular, e também são despolarizadas, aumentando o processo de *feedback* positivo iniciado nos terminais sinápticos. Através da glia é feita a limpeza do excesso de K^+ do meio extra-celular, como mostra a figura 1.8. Neste caso, o humor vítreo desempenha o papel de maior importância como potencial sorvedouro de K^+ . Há ainda, no meio extra-celular, difusão de potássio, também promovendo o alastramento da onda. A partir daí o rearranjo de outros íons (como Na^+ , Cl^- , Ca^{++} e água) ocorre entre os dois espaços, considerando-se a necessidade do equilíbrio osmótico e a manutenção da eletroneutralidade do meio.

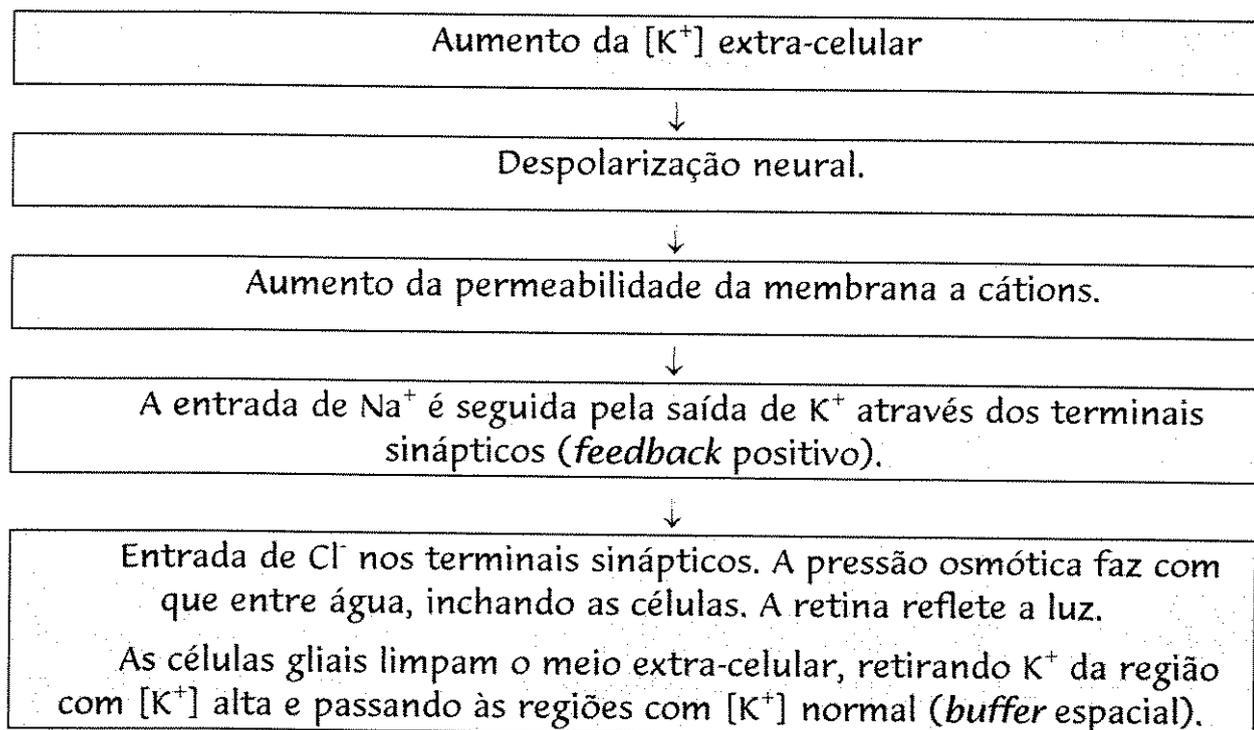


Figura 1.7- Sequência de eventos durante a propagação da DA.

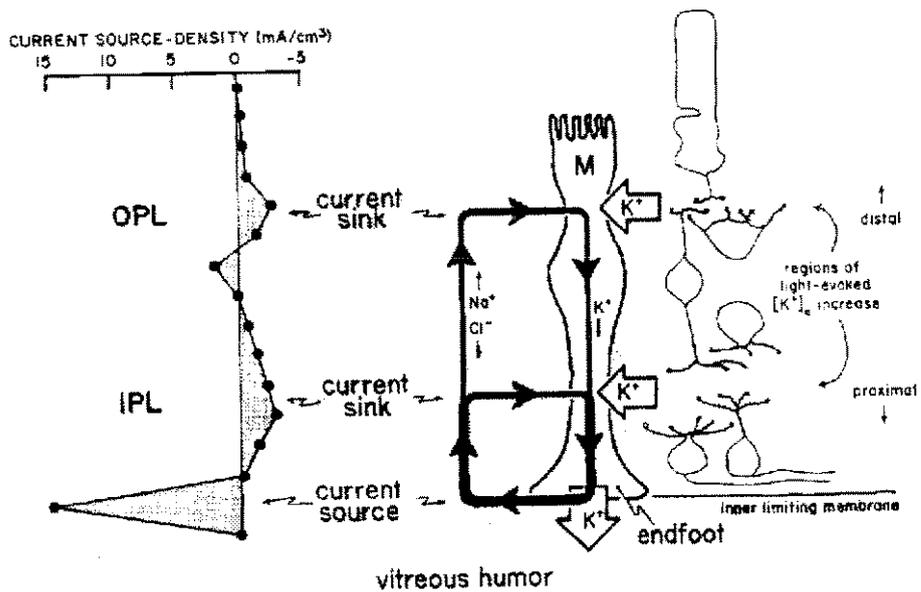


Figura 1.8 - *Buffer* espacial. fontes e sorvedouros de K^+ durante a DA. Modificado de Newman (1985).

Tem-se estudado tradicionalmente as alterações das concentrações dos íons potássio, cálcio, sódio, cloro e o pH no meio extra-celular, como as apresentadas acima (Castro e Martins-Ferreira, 1970, doCarmo e Martins-Ferreira, 1984, Martins-Ferreira e doCarmo, 1987, Bureš, 1993 e Chebabo et. al., 1993), além da variação lenta da diferença de potencial e das mudanças na refratividade de luz no tecido (sinal IOS clássico). Experimentos mais complexos, com a aquisição do sinal óptico em duas faixas de frequência (vermelha e azul) e a medida de cálcio intra-celular através da medida de fluorescência extrínseca também são possíveis na retina (Fernandes de Lima et al., 1994), mostrando as possibilidades de avaliação do fenômeno e da sua comparação com outros modelos experimentais já estudados.

1.3. Sistemas relacionados

Com o objetivo de estudar teoricamente o fenômeno da DA, alguns tipos de associações têm sido feitas, e diversos modelos propostos, adotando-se níveis diferentes de análise (Haken, 1977). Dependendo da interpretação dada ao fenômeno, pode-se inseri-lo em classes de sistemas diferentes. Por exemplo, a reação química de Belousov-Zhabotinsky (BZ), descoberta em 1952 (Zaikin e Zhabotinsky, 1970 e Becker, 1977), apresenta semelhança geométrica com a DA, como se pode observar pela figura 1.9; porém, mais importante que isso é que tanto o processo de auto-catálise (fundamental para a ocorrência das oscilações) quanto as fases exibidas pelo sistema BZ, que são: [1] quiescente, [2] excitado e [3] refratário, podem ser

igualmente evidenciadas na DA. Isso torna os dois sistemas bastante próximos em termos da descrição macroscópica e das suas principais características enquanto meios excitáveis susceptíveis à propagação de ondas. Os modelos empregados em sistemas de equações de reação-difusão (Prigogine e Stengers, 1984, Ross et al., 1988 e Scott, 1987) são também possíveis descrições para a DA. Dentre os sistemas comumente modelados desta forma, podemos citar: padrões de excitação e relaxamento no músculo cardíaco dos mamíferos (Winfree, 1994), as ondas de cálcio em ovos de *Xenopus* (Jouaville et al., 1995) e a maior parte dos sistemas presa-predador (Haken, 1977 e Murray, 1989). A agregação da ameba *Dictyostelium discoideum*, que ocorre quando há falta de alimento no meio, gerando padrões geométricos em espiral parecidos com a DA, também pode ser citada como um sistema do mesmo tipo. Em Física, podemos citar a instabilidade de Bénard (ou de Taylor), em que, dependendo do número de Rayleigh (se o gradiente de temperatura é suficientemente alto) para uma camada de fluido que é aquecida por baixo, o fluido apresenta um movimento macroscópico e forma padrões espaciais estruturados e bem ordenados.

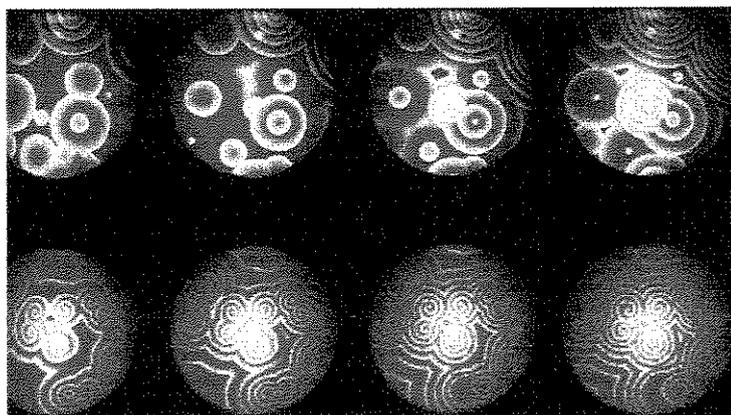


Figura 1.9- A reação de Belousov-Zhabotinsky.

Em muitos dos sistemas, os padrões geométricos formados são estáticos (Agladze et al., 1994), e modelados com a aplicação direta das equações de reação-difusão na forma proposta inicialmente por Fick (Murray, 1989). Contudo, tratamos de estruturas que se desenvolvem (algumas contínua e espontaneamente) no tempo e no espaço, e torna-se relevante o seu estudo dinâmico, a análise dos processos por que passa o sistema durante a propagação das ondas (Field e Noyes, 74a e b). Em particular, na DA duas características fundamentais devem ser levadas em conta: o *feedback* positivo e um processo de transporte, e ambas devem ser descritas, neste caso, segundo os processos, a nível celular, dos quais são consequência. Além disso, como se trata de um fenômeno geral, que ocorre na matéria cinzenta, não se pode

condicionar as ondas a características que sejam específicas da retina, por exemplo, e que não estejam presentes em outras partes da matéria cinzenta. Há também condições de contorno, que se referem à velocidade do estímulo aplicado (no caso do potássio), ao sistema em que se trabalha (por exemplo, a solução fisiológica, velocidade de perfusão), temperatura, bordas da retina, etc.

2. Modelos analíticos e sintéticos

A partir da descrição do fenômeno da depressão alastrante a nível macroscópico, é possível empregar um modelo bastante simples, baseado em autômatos celulares (Toffoli e Margolus, 1988 e Ermentrout, 1993), com regras que determinam o comportamento de cada elemento do sistema a partir do estado de seus vizinhos. Este modelo pode ser considerado como um modo analítico (*top-down*) de interpretar o fenômeno da DA. Por outro lado, partindo dos processos inerentes a este fenômeno, como a dinâmica de canais e bombas presentes na membrana celular, e descrevendo os mecanismos relevantes para a ocorrência de ondas em meios excitáveis, é possível modelar este fenômeno de forma sintética (*bottom-up*). A seguir descrevemos estes dois modelos, apontando suas principais características.

2.1. Autômatos celulares: enfoque analítico

Em 1970, na coluna Mathematical Games da revista Scientific American, Martin Gardner publica um artigo sobre o jogo Life (Gardner, 1970), relatando idéias do matemático inglês John Conway, que propunha uma forma simples para modelar características vitais, colocando regras que determinassem o nascimento, sobrevivência e morte de uma população. Ele partiu dos seguintes axiomas:

- Não deveria haver um padrão para o qual há uma prova simples de que a população pode crescer sem limite.
- Deveria haver padrões iniciais que aparentemente crescem sem limite.
- Deveria haver padrões iniciais simples, que crescem e mudam por um período considerável de tempo antes de chegar a um fim, que pode ser de três maneiras:
 1. chegando a uma configuração estável que não muda depois disso.
 2. entrando numa fase oscilatória onde dois ou mais períodos se repetem indefinidamente.
 3. desaparecendo completamente.

As regras, portanto, devem ser tais que o comportamento da população seja imprevisível. As regras inicialmente propostas são:

- I. **nascimento** - cada célula vazia adjacente a exatamente três outras células é uma célula que nascerá na próxima geração, na qual uma marca é colocada na próxima geração, passando a ser denominada célula marcada.
- II. **sobrevivência** - toda célula marcada com duas ou três células adjacentes marcadas sobrevive para a próxima geração.
- III. **morte** - toda célula marcada com quatro ou mais vizinhos marcados morre de superpopulação. Toda célula marcada que tenha um ou nenhum vizinho marcado morre de isolamento.

Com estas regras, um papel quadriculado, uma configuração inicial de células vivas (já com montador inicializado) e muita paciência (sem usar computador), Gardner verificou os três tipos de comportamentos anteriormente previstos. Em outras palavras, o jogo é uma seqüência de mapas que descreve mudanças dinâmicas a partir de uma distribuição populacional inicial, relacionando assim movimento no espaço e no tempo. O mesmo procedimento poderia ser usado para muitos outros sistemas, como de fato aconteceu. Generalizando os requisitos e as regras, ou seja, mudando as condições de contorno que faziam com que o jogo se chamasse “vida” (*life*), mas mantendo a idéia de que cada célula de um conjunto segue determinadas regras, que ditam o seu estado na geração seguinte, o jogo se transformou nos **autômatos celulares** (Gardner, 1971, Greenberg e Hastings, 1978 e Greenberg et al., 1978, Toffoli e Margolus, 1988).

Nos últimos dez anos, bastante atenção tem sido dada aos autômatos celulares (CA's) a nível teórico e prático. Do ponto de vista teórico, há diversos tipos de classificações (Gutowitz, 1990 e Boccara et al., 1991), análise de complexidade de cálculo (Gutowitz, 1991) e propostas de novos modelos (Haeseler et al., 1995). Em termos de modelos, os CA's são utilizados para simular fenômenos tão variados quanto a oxidação do monóxido de carbono catalisada por cristais de paládio (Gerhardt e Schuster, 1989 e Richard et al., 1990), trilhas de formigas e sinais químicos (ferormônios) deixados por elas (Ermentrout, e Edelstein-Keshet, 1993).

Os CA's são tradicionalmente classificados em *lattice gas*, de solidificação e determinísticos ou Eulerianos, de acordo com as aplicações e formas de implementação a que se refiram. Em qualquer um deles, entretanto, os métodos para a derivação do modelo são a tradução do fenômeno observado em regras empíricas simples, ignorando qualquer analogia

com um possível modelo matemático (Müller, 1988), ou a discretização do modelo matemático, reduzindo-o de forma a obter um autômata (Barkley, 1991).

As principais vantagens dos CA's são a simplicidade de implementação e a visualização durante as simulações (Krinsky e Efimov, 1992 e Krinsky et al., 1992). Além disso, a capacidade de apresentar comportamentos globais a partir de interações locais entre seus elementos é um fator relevante na sua escolha para o modelamento de sistemas dinâmicos complexos (Victor, 1990 e Reggia e Montgomery, 1996). Contudo, se é necessário obter dados quantitativos, isto é, se o nível de comparação com o sistema real deve chegar a detalhes, a capacidade computacional requerida nas simulações é muito alta, e nesse caso são mais indicados modelos do tipo *bottom-up*.

2.2. Meios excitáveis: enfoque sintético

Outro enfoque possível na análise da DA é considerar espécies químicas difundindo num meio não homogêneo, em que ocorre ainda o *feedback* positivo. Há que se considerar influências como a do transporte ativo e passivo de íons através da membrana celular. Note que este enfoque sugere um modelo para o qual são necessários dados quantitativos, mas que é adequado para avaliação dinâmica dos diversos fenômenos concomitantes durante a DA.

Este modelo, baseado em equações de reação-difusão, é comumente utilizado em sistemas químicos (Kapral, 1995 e Dellnitz et al., 1995) e parte de premissas básicas sobre o sistema a ser modelado, isto é, requer o conhecimento quantitativo de parâmetros relevantes nas interações locais. O paradigma da influência mútua entre elementos do sistema, gerando comportamentos globais interpretados como auto-organizados é freqüentemente mencionado como imprescindível neste tipo de modelamento (Murray, 1989, Jouaville et al., 1995 e Meinhardt, 1995). Um dos primeiros artigos adotando este enfoque foi publicado em 1952, por Turing (Turing, 1952), e apresenta um modelo baseado em interações de espécies químicas para caracterizar a morfogênese. O modelo é generalizável para qualquer sistema em que se tenha a descrição da dinâmica de cada um dos elementos e em que se tenha informação sobre a sua interação com outros elementos. Nas últimas décadas, a grande maioria dos modelos utilizando equações de reação-difusão tem sido desenvolvida para sistemas químicos e biológicos.

Considerando meios excitáveis com capacidade de exibição de ondas, alguns dos modelos mais conhecidos são: FitzHugh-Nagumo (Nagumo et al., 1962), Oregonator (Field e Noyes, 1972) e Brusselator (Prigogine e Stengers, 1984). O fenômeno da DA apresenta os mesmos tipos de comportamento e processos similares a sistemas (como BZ) cujos modelos mais estudados são estes três. Por isso justifica-se a utilização deste enfoque para a DA.

Apresentamos a seguir uma dedução informal da equação generalizada da difusão, feita a partir de uma versão apresentada em (Hoppensteadt e Peskin, 1992, cap.4).

Considere uma seqüência de árvores (alinhadas), numeradas de acordo com a seqüência dos números inteiros, como ilustrado abaixo (figura 2.1). Algumas estão infestadas com insetos. De acordo com o número de insetos e seu comportamento são formuladas regras.

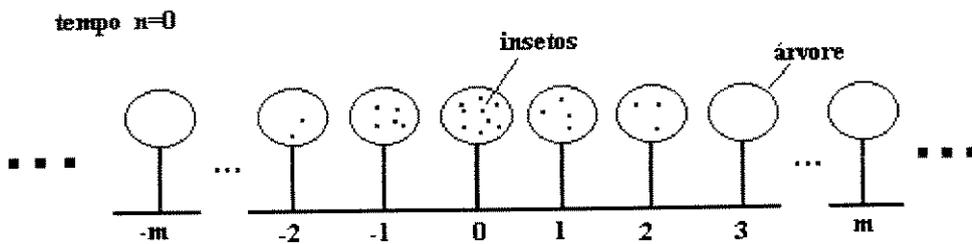


Figura 2.1- Seqüência de árvores infestadas com insetos, representadas no instante $n=0$.

Seja ainda $U_{m,n}$ a proporção da população total de insetos que está na árvore m na amostra de tempo n . Os insetos são contados em intervalos de tempo fixos. Em cada intervalo, um inseto se move para a árvore mais próxima à esquerda com probabilidade q ou para a direita com probabilidade q , ou fica na mesma árvore com probabilidade $1-2q$ (onde $q < 1/2$). A probabilidade q mede a mobilidade dos insetos. A população de insetos é considerada constante. A distribuição de insetos na árvore m no momento $n+1$ é dada por:

$$U_{m,n+1} = (1-2q) \cdot U_{m,n} + q \cdot (U_{m-1,n} + U_{m+1,n}) \quad (1)$$

Este modelo tipo *passeio aleatório* pode ser generalizado para o caso contínuo, fazendo x variar no intervalo $[-1,1]$, sendo x a localização da m -ésima árvore. Adotando δx e δt no sentido usual, de um intervalo (de espaço ou de tempo) suficientemente pequeno, buscamos uma função contínua por partes tal que

$$u(m \delta x, n \delta t) \approx U_{m,n} \quad (2)$$

Substituindo (2) em (1), temos:

$$u(x, t + \delta t) = (1 - 2q)u(x, t) + q[u(x + \delta x, t) + u(x - \delta x, t)] \quad (3)$$

e, portanto,

$$\frac{u(x, t + \delta t) - u(x, t)}{\delta t} = q \frac{\delta^2 x}{\delta t} \frac{[u(x + \delta x, t) + u(x - \delta x, t) - 2u(x, t)]}{\delta^2 x}$$

E, como proposto por Einstein (Einstein, 1956), considerando-se δx e δt próximos de zero de forma a fazer $q \delta^2 x / \delta t = D$ constante, tem-se :

$$\frac{\partial u}{\partial t} = D \frac{\partial^2 u}{\partial x^2}$$

onde D é chamada difusividade.

Agora consideremos a equação de conservação geral, em que a taxa de variação de uma determinada substância (ou população, ou matéria) num volume (V) é igual ao fluxo líquido através da superfície (S) que engloba V mais o que é criado dentro de V . Assim,

$$\frac{\partial}{\partial t} \int_V u(x, t) dv = - \int_S J ds + \int_V f(u, x, t) dv$$

onde J é o fluxo da substância considerada e f é a fonte da substância. Aplicando o teorema da divergência à integral de superfície, e assumindo $u(x, t)$ contínua, temos:

$$\int_V \frac{\partial u(x, t)}{\partial t} dv = - \int_V \nabla \cdot J dv + \int_V f(u, x, t) dv$$

$$\int_V \left[\frac{\partial u(x, t)}{\partial t} + \nabla \cdot J - f(u, x, t) \right] dv = 0$$

A equação de conservação para u é, portanto:

$$\frac{\partial u(x, t)}{\partial t} = - \nabla \cdot J + f(u, x, t)$$

Admitindo que o processo através do qual se dá o fluxo (J) é a difusão clássica, temos que $J = -D \nabla u$ (lei de Fick). Assim,

$$\frac{\partial u(x, t)}{\partial t} = - \nabla \cdot (-D \nabla u) + f(u, x, t)$$

e, como D é constante,

$$\frac{\partial u(x,t)}{\partial t} = -D\nabla^2 u + f(u,x,t)$$

A partir da equação acima (chamada de equação de reação-difusão), que deve ser aplicada tanto no meio extra quanto intra-celular, dividindo o termo da difusão em vários fatores (um para cada íon), e ainda associando $f(u,x,t)$ a mudanças de condutância, dependência da temperatura e estímulos externos, torna-se possível um modelo apropriado para a DA (Tuckwell e Miura, 1978). Destacamos que qualquer modelo que se faça pode ser sempre adaptado, de acordo com os resultados que apresentar ou através da comparação com experimentos.

Para a simulação dos mecanismos celulares considerados no modelo baseado nas equações de reação-difusão é necessária a sua descrição matemática, como apresentamos a seguir.

Dada a dificuldade de obtenção de dados quantitativos a respeito da composição iônica e de alterações a nível celular durante a propagação da onda, e levando em consideração que a DA ocorre em qualquer parte da matéria cinzenta, isto é, as condições para a DA devem ser as mais gerais possíveis, optou-se por desenvolver o modelo a partir de funções que descrevam o comportamento de cada elemento incluído (Tuckwell, 1988). Sempre que possível foram utilizadas equações tradicionais, como por exemplo a equação de Nernst para o potencial de equilíbrio iônico, ou a de GHK (Goldman-Hodgkin-Katz) para o potencial de membrana. Passamos à discussão de tais funções. Quando o estudo preliminar indica que uma função varia pouco em relação a uma determinada variável, esta passa a ser considerada constante no valor de repouso do sistema (ou seja, em algum ponto de equilíbrio estável).

Neste modelo o potencial de repouso da glia (V_g) segue o potencial de equilíbrio do potássio, que é dado pela equação de Nernst:

$$V_g = 58 \cdot \log\left(\frac{[K]_{ec}}{[K]_{ic}}\right)$$

onde $[K]_{ec}$ e $[K]_{ic}$ são, respectivamente, as concentrações de potássio nos meios extra e intra-celular, e que, a partir daqui, representaremos simplesmente por K_{ec} e K_{ic} . Os valores de repouso destas variáveis são: $K_{ec} = 4\text{mM}$ e $K_{ic} = 140\text{mM}$ (aproximadamente), e V_g é dada em

miliVolts (mV). A função é mostrada na figura 2.2 a seguir, para K_{ic} de 100 a 180 e K_{ec} de 1 a 60 (mM).

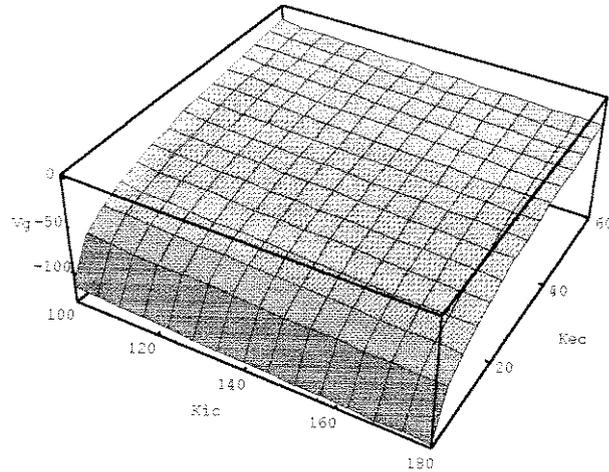


Figura 2.2 - Potencial de membrana na glia.

Para os terminais sinápticos, a equação proposta em (Tuckwell et al., 1981) é uma simplificação da equação de GHK:

$$V_{ts} = 58 \cdot \log \left(\frac{P_k K_{ec} + P_{Na} Na_{ec} + P_{Cl} Cl_{ic}}{P_k K_{ic} + P_{Na} Na_{ic} + P_{Cl} Cl_{ec}} \right)$$

onde P_i indica a permeabilidade da membrana àquele íon (i) específico, e V_{ts} é dada em mV. Na equação simplificada, apenas o potássio é considerado, após uma análise numérica da influência da alteração da permeabilidade da membrana aos outros íons (Na e Cl). Sublinhamos que na despolarização há uma grande variação nas permeabilidades a todos os íons, em momentos diferentes, gerando os fluxos de corrente individuais que podem levar, por exemplo, à propagação do potencial de ação. A equação proposta em (Tuckwell e Miura, 1978) é:

$$V_{ts} = 58 \cdot \log \left(\frac{K_{ec} + 9}{K_{ic} + 40} \right)$$

cujo gráfico é apresentado a seguir:

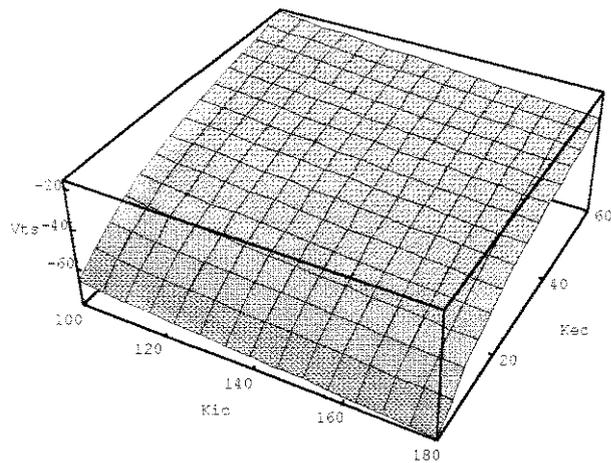


Figura 2.3 - Potencial de membrana nos terminais sinápticos

Simplificaremos ainda mais a função V_{ts} , observando que uma grande excursão em K_{ic} não significa uma variação muito alta em V_{ts} . Assim, admitindo $K_{ic} = 140$ (mM), temos:

$$V_{ts} = 58 \cdot \log\left(\frac{K_{ec} + 9}{180}\right)$$

e o gráfico é:

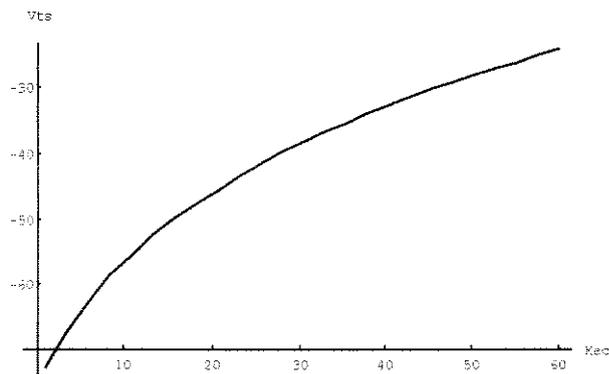


Figura 2.4 - Potencial de membrana nos terminais sinápticos em função de K_{ec} .

De acordo com a seqüência de eventos proposta para a DA (ver capítulo 1), apesar da importância dos íons cálcio, sódio e cloro, simplificamos o modelo considerando apenas a dinâmica de bombas (de sódio-potássio) e canais para o potássio (tanto na glia quanto nos terminais sinápticos). O interesse principal é representar os dois mecanismos identificados na DA, a saber: o *feedback* positivo e o *buffer* espacial. Admite-se ainda a difusão, mas apenas no meio extra-celular. Alguns autores preconizam a necessidade da difusão dentro das células

gliais. Mostraremos que este mecanismo não é essencial à ocorrência de ondas na matéria cinzenta.

Nos terminais sinápticos, as bombas de sódio-potássio são aceleradas pelo aumento e potássio no extra-celular e pelo aumento de sódio no intra-celular. Portanto, a derivada da concentração de K_{ic} é função da aceleração das bombas:

$$\frac{\partial K_{ic}}{\partial t} = f(K_{ec}, Na_{ic})$$

que pode ser aproximada por (segundo Tuckwell (1980)):

$$\frac{\partial K_{ic}}{\partial t} = \frac{130 \cdot (K_{ec} \cdot Na_{ic})}{K_{ec} \cdot Na_{ic} + 15 \cdot K_{ec} + 4 \cdot Na_{ic}}$$

e o gráfico é:

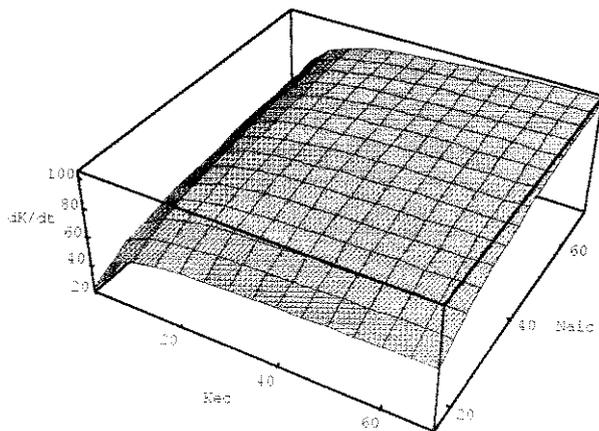


Figura 2.5 - Dinâmica de bombas nos terminais sinápticos

Novamente, observando a pequena influência de Na_{ic} , simplificamos para:

$$\frac{\partial K_{ic}}{\partial t} = 29,5 + \frac{780 \cdot K_{ec}}{22,5 \cdot K_{ec} + 60}$$

cujo gráfico está a seguir:

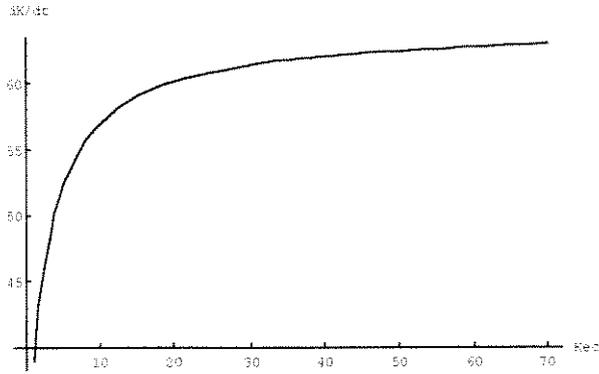


Figura 2.6 - Dinâmica de bombas nos terminais sinápticos como função de K_{ec} .

Em geral, os canais de potássio apresentam o seguinte comportamento:

$$\frac{\partial K_{ec}}{\partial t} = -58 \cdot \log\left(\frac{K_{ec}}{K_{ic}}\right) + 58 \cdot \log\left(\frac{K_{ec} + 9}{K_{ic} + 40}\right)$$

que significa que, quanto maior o gradiente eletro-químico do potássio, mais potássio sai da célula considerada. O gráfico de função acima é:

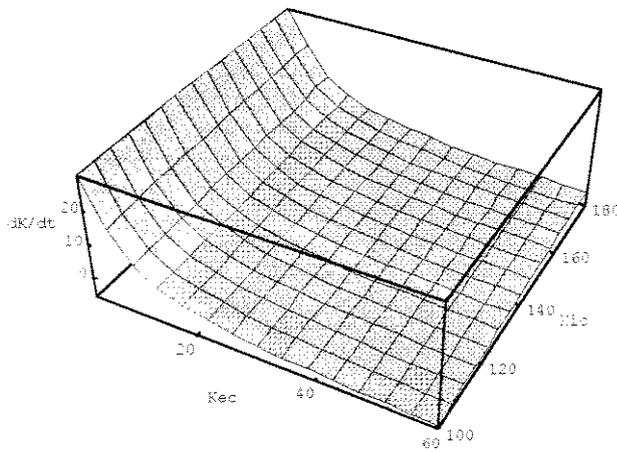


Figura 2.7 - Dinâmica de canais de potássio nos terminais sinápticos.

Entretanto, é necessário agora incluir o mecanismo (observado na DA) do *feedback* positivo. Sabe-se que, dependendo da velocidade de aumento da concentração de potássio no meio extra-celular, a entrada de potássio pelas bombas não é suficiente para superar a saída pelos canais, devido a um aumento brusco da condutância ao potássio na membrana. Para simular este efeito, propomos o seguinte comportamento: (admitindo $K_{ic} = 140\text{mM}$)

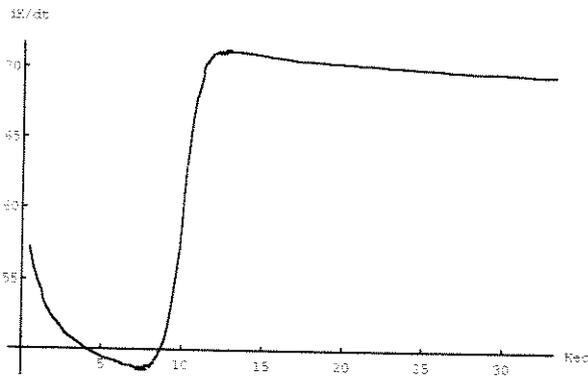


Figura 2.8 - Dinâmica de canais de potássio nos terminais sinápticos, incluindo o mecanismo de auto-catálise.

Na figura acima, no eixo das ordenadas representa a velocidade de saída de potássio dos terminais sinápticos. A figura se refere à seguinte equação:

$$\frac{\partial K_{ec}}{\partial t} = \left(-5,8 \cdot \log\left(\frac{K_{ec}}{140}\right) + 5,8 \cdot \log\left(\frac{K_{ec}+9}{180}\right) + 29 \right) \cdot (0,4 \cdot \operatorname{tgh}(K_{ec} - 10) + 2)$$

Para a análise da função acima, apresentamos a seguir os gráficos relativos aos canais e bombas de potássio nos terminais sinápticos sobrepostos. Note que no caso das bombas modelamos a velocidade de entrada de potássio, enquanto que para os canais tratamos da saída de potássio. Para a obtenção do fluxo líquido de potássio pela membrana faz-se então a subtração de uma função pela outra.

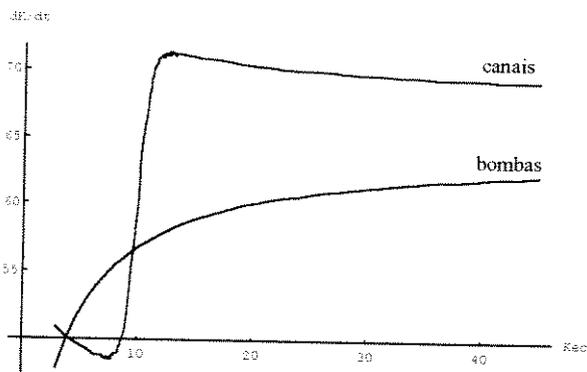


Figura 2.9 - Relação entre as dinâmicas de bomba e canal nos terminais sinápticos.

Observa-se, na figura anterior, que para níveis de K_{ec} entre 4 e 10mM (aproximadamente), tem-se a entrada de potássio nas células maior do que a saída, mas acima de 10mM a derivada da função para os canais aumenta, e há uma saída de potássio que não é contrabalanceada pelas bombas. Os terminais sinápticos recuperam os níveis de repouso de

potássio apenas após a volta do nível extra-celular de potássio a valores abaixo de 10mM (o que é feito pela glia e pela difusão extra-celular).

No caso da glia, as dinâmicas de bombas e canais de potássio são simuladas da forma como segue:

bombas de potássio:
$$\frac{\partial K_{ic}}{\partial t} = \frac{K_{ec}}{K_{ec} + 4}$$

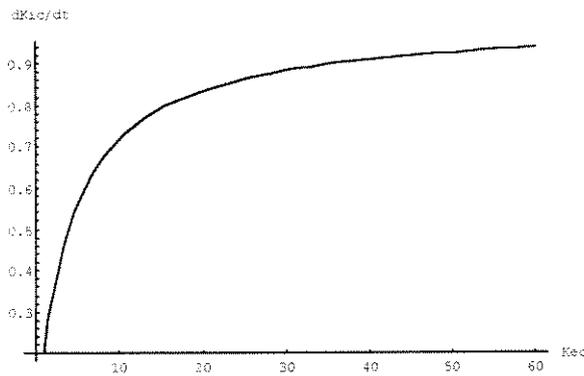


Figura 2.10 - Bombas de potássio na glia.

canais de potássio:
$$\frac{\partial K_{ec}}{\partial t} = 0,8 - 0,58 \cdot \left[\log\left(\frac{K_{ec}}{K_{ic}}\right) - \log\left(\frac{K_{ecr}}{K_{icr}}\right) \right]$$

onde $K_{ecr} = 4\text{mM}$ e $K_{icr} = 140\text{mM}$ (valores de repouso destas variáveis).

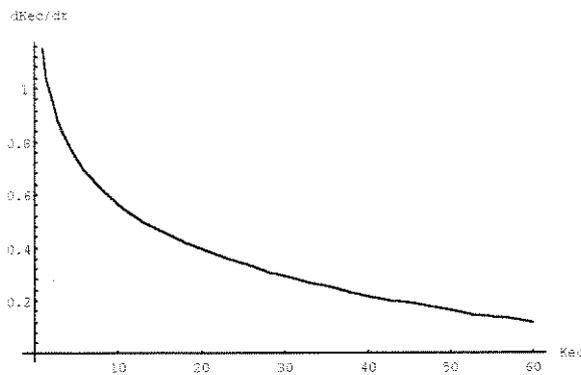


Figura 2.11 - Canais de potássio na glia.

Novamente temos as bombas e canais sendo descritos pela entrada e saída de potássio, respectivamente.

O mecanismo de *buffer* espacial é incluído no modelo através da configuração espacial adotada para cada célula de Müller, que possui de 9 a 15 processos celulares, e admitindo as duas equações anteriores para cada processo.

1. Materiais e Métodos

Neste capítulo apresentamos a descrição das preparações biológicas feitas e dos recursos computacionais utilizados na análise estatística dos dados e na implementação dos modelos.

1.1. Preparações biológicas e registros

O modelo experimental utilizado foi a retina de pintainho. Estima-se que aproximadamente 150 animais tenham sido usados, incluídos aqui os necessários para o aprendizado das técnicas de dissecação e preparação. A seguir descrevem-se tais técnicas, os equipamentos e produtos químicos utilizados e os métodos de registro eletro-fisiológico.

1.1.1. Animais

Pintainhos de ambos os sexos são adquiridos no seu primeiro dia de vida, mantidos à temperatura ambiente entre 20 e 30°, numa área de 10m² (para 10 a 15 animais), e alimentados diariamente com ração e água. São utilizados animais em idade entre 6 e 14 dias de vida.

1.1.2. Equipamentos e produtos químicos

Os materiais e equipamentos listados a seguir foram utilizados na montagem dos experimentos:

Banho:	Klöttermann
Binocular:	Leica, aumentos de 6,3; 10; 16; 25; 40
Bomba de infusão:	Spetec, tipo Perimax 12. (até 5ml/min)
Câmera:	Hitachi Denshi Ltda., KP-140E/K, CCTV camera, 12V e 300mA
Conversor A/D:	Advantech, PC-LabCard PCL-812PG A/D de 12 bits, 16 canais, input ranges de +/-5V a +/- 0,3125V, 30kHz (máx.)
Filtro:	GEPA, München, tipo Geh. A011-N1/5
Iluminador:	Schott, tipo KL 1500 (eletrônico)
Lâmina (bisturi):	Bahya, tamanho 26
Manipulador:	Bachofer, Reutlingen, controlado por motor-de-passo
Micro-computador:	PC-486
Microfone:	MDE, DM-202
Placas de Petri:	Fluncon, volume aproximado de 8ml, diâmetro de 3,5cm
Pré-amplificador:	WP-I, FD 223
Puxador de micro-pipetas:	David Kopf M750

Termômetro digital:	Summit - TA-1, saídas nas faixas de 200mV e 2V, 1°/mV
Tubos de vidro:	WP-I. Diâmetro de 1mm, com filamento
Vídeo cassete:	Panasonic, NV 600

O *setup* é composto basicamente de uma gaiola de Faraday (de aproximadamente 1m³) montada sobre uma placa de cimento, que por sua vez é apoiada sobre quatro bolas de tênis, com a finalidade de amortecer vibrações. O microscópio binocular é posicionado sobre a preparação, a câmera é acoplada a uma de suas lentes e conectada ao vídeo-cassete. O micro-manipulador é colocado dentro da gaiola. O balão volumétrico contendo a solução de perfusão é imerso no banho com temperatura controlada, e a solução chega à preparação impulsionada pela bomba de infusão. Além deste controle, há ainda uma placa de alumínio sob a placa de Petri (com a preparação), em que se mantém a temperatura constante no caso de perfusão parada. No raque, tem-se então a fonte que controla a tensão na placa de alumínio (cuja área é de 200cm²), o ajuste de *off-set*, o filtro, o vídeo-cassete, o pré-amplificador e o osciloscópio.

Os produtos químicos testados são diluídos na solução de Ringer e perfundidos na mesma velocidade utilizada para a aquisição das ondas controle. Com exceção do propranolol, que foi obtido como doação da Wyeth, todos os outros produtos, inclusive aqueles necessários à preparação da solução de Ringer (ver item 3.1.5), são das marcas Merck ou Sigma. A molaridade final da solução ou a percentagem em volume é apresentada na lista a seguir, que contém as drogas utilizadas nos experimentos:

- Cloreto de bário (BaCl₂) a 4mM (peso específico de 244,28g/mol). A solução é passada por filtro de 0,45μM, e a concentração final fica por volta de 500μM.
- Cloreto de sódio (NaCl) a 140mM (58,44g/mol)
- Sódio-barbital, a 500μM (206,18 g/mol)
- Glicerol, a 5%, 7,5% e 10%
- Propanol, a 5%
- Propranolol, a 500μM (295,15 g/mol)

3.1.3. Registro eletro-fisiológico

O registro eletro-fisiológico é feito com os micro-eletrodos comumente usados nas medidas de potencial extra-celular; a sua ponta tem um diâmetro por volta de 10μm, e resistência de 10MΩ. Tais eletrodos são feitos com um puxador digital, e preenchidos, pelo método de *back-filling*, com uma solução de KCl a 0,1M (Purves, 1981, cap. 2). Para a

conexão com a *micro-probe* ligada ao pré-amplificador utilizou-se uma *pellet* com contato de ouro, e como referência foi usado um fio de prata cloretado.

Um esquema geral do *setup* é mostrado na figura 3.1. Através de um filtro passa-baixa regulado para uma frequência de corte de 20Hz (-3 dB), corta-se o ruído no sinal original, e mantém-se a parte que interessa, já que esta ocorre numa frequência abaixo de 10Hz. Além disso, multiplica-se o sinal 200 vezes, ligando em série o filtro de 20Hz, que também amplifica 10 vezes, e um controlador de *off-set*, que multiplica por 20 a sua entrada. O controle de *off-set* é necessário para manter o sinal dentro do intervalo de tensão lido pela placa conversora A/D, que é de -5 a +5V. O nível real de ruído é de 100 μ V, sendo que as amplitudes do sinal de interesse são da ordem de 10mV. A aquisição é feita com frequência de amostragem de 20Hz, e todo o sinal adquirido é gravado em formato binário, em micro-computador, para análise posterior (ver item 3.2).

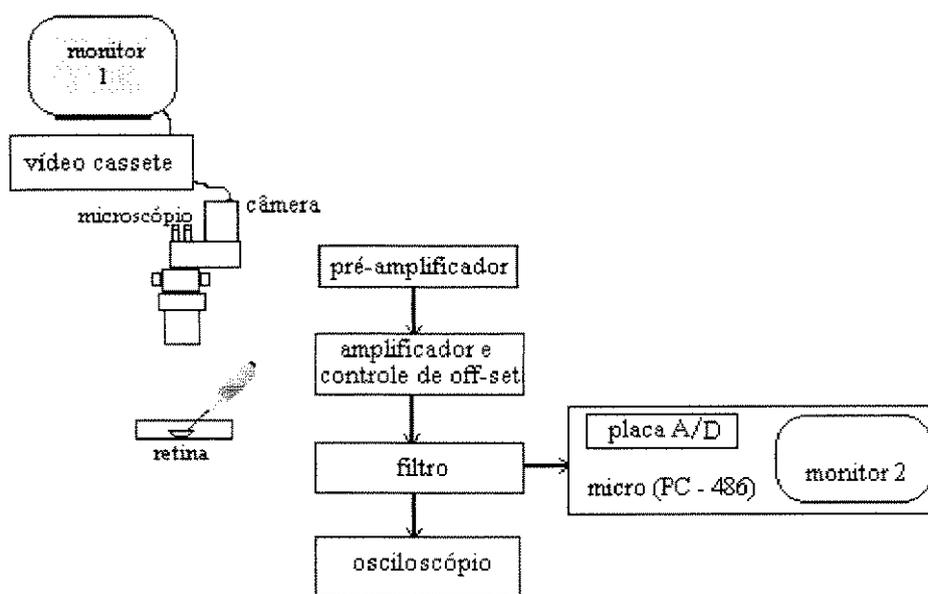


Figura 3.1 - Esquema geral do setup básico usado nos experimentos

3.1.4. Registro óptico

O sinal óptico é gravado em vídeo no sistema PAL-G (alemão), com uma câmera (imagem em preto-e-branco) acoplada ao microscópio. As imagens em vídeo são posteriormente digitalizadas e analisadas (ver item 3.2). Durante a gravação do sinal óptico, é possível

também a gravação de sons, através de um microfone comum. Como para o início da aquisição do sinal elétrico pressiona-se a barra de espaço, o sincronismo temporal entre os dois sinais é facilmente obtido.

3.1.5. Procedimentos

Com relação à preparação biológica, os pintainhos são decapitados e seus olhos dissecados imediatamente (Martins-Ferreira et al., 1974, Fernandes de Lima et al., 1997). A câmara anterior é cortada no equador e o humor vítreo removido. A câmara posterior é imersa em solução de Ringer, contendo NaCl a 100mM, KCl a 6mM, MgCl₂ a 1mM, NaH₂PO₄ a 1mM, NaHCO₃ a 30mM, glicose a 30mM, Tris a 5mM e CaCl₂ a 1mM. O pH é ajustado em 7,4 através da adição de HCl concentrado (solução padrão).

Uma das retinas é colada no fundo de uma placa de Petri, e a taxa de perfusão é mantida a 4ml/min. A temperatura da solução é mantida entre 28 e 30°. As ondas são elicitadas química (com KCl a 100mM) ou mecanicamente (com a ponta de um eletrodo), a intervalos de tempo acima de 10 minutos, sempre o mais longe possível da micro-pipeta, para evitar possíveis influências do estímulo no registro eletro-fisiológico.

Com duas lâmpadas acesas sobre a preparação, o micro-eletrodo é posicionado sobre a superfície, apenas tocando a retina. Abaixa-se o eletrodo (usando o micro-manipulador) até que as duas sombras dele se toquem. Após 10 minutos faz-se a primeira elicitação. Todas as medidas eletro-fisiológicas são feitas na IPL, posicionando-se o micro-eletrodo, após o toque na retina, pelo ponto de maior diferença de potencial elétrico durante a passagem da onda. O local que apresenta a maior alteração de campo elétrico durante a DA é a IPL, como mostrado no capítulo 1.

Após a estabilização da linha de base, fazem-se pelo menos duas aquisições de ondas controle, enquanto a retina é perfundida com Ringer, e então ela passa a ser tratada com uma das substâncias químicas listadas no item 3.1.2. Depois que o volume da placa de Petri é trocado duas vezes, retomam-se as elicitações, e outras ondas são adquiridas (em geral 2 ou 3). A perfusão é feita novamente com a solução de Ringer padrão, com o objetivo de se obter a recuperação do tecido.

3.2. Recursos computacionais

3.2.1. Análise de dados

Foram gravadas três fitas de vídeo (12 horas), com mais de 250 ondas no total. Para cada onda gravada em vídeo há um perfil elétrico correspondente, gravado em micro-computador.

Para a visualização e medidas no sinal elétrico foi utilizado o pacote alemão SIGNALYS, devido à facilidade na importação e conversão de arquivos binários. Os seguintes parâmetros foram extraídos de cada onda:

- tempo de subida da onda - **ts**;
- tempo de descida - **td** (desde o pico da onda até a repolarização);
- amplitude, que neste caso é a diferença de potencial associada ao intervalo **ts**;
- valor e o instante em que ocorre o pico da derivada do sinal elétrico (**Pder**).

Havendo *undershoots* na onda de potencial, tem-se ainda o instante em que ocorrem e sua amplitude. Todas as ondas foram analisadas. A figura 3.2 a seguir apresenta um exemplo das medidas feitas, com as siglas utilizadas acima. Neste gráfico, o tempo de subida é de 7 segundos (ou seja, de 13,5 a 20,5 seg), o de descida 35,5 seg e a amplitude é de 18,6mV. A derivada ocorre a 17 segundos, e tem um pico de 14,4 mV/seg. A partir destes dados são calculados ainda o tempo de duração total (**ts + td**), o intervalo entre o pico da derivada e o pico da onda, e entre o início da onda e o pico da derivada.

Quadros referentes a algumas das ondas, escolhidas segundo o contraste e posicionamento do micro-eletrodo, são digitalizados com o sistema Sprynt da SYNOPTICS, com aquisição de quadros em tempo real, placa de processamento I-860 ligada a um PC-486 e monitor "true color". O processamento das imagens é feito com o *software* SEMPER6P, também da SYNOPTICS. Como este sistema permite o desenvolvimento de programas, e como todas as ondas devem ser analisadas da mesma forma, o programa do apêndice 1 foi feito para automatizar o processamento descrito a seguir.

A cada onda, adquirem-se os quadros referentes aos instantes obtidos a partir do sinal eletro-fisiológico, a saber:

- 1 - início da aquisição feita pela placa A/D;
- 2 - início da subida da onda elétrica;

- 3 - pico da derivada do sinal elétrico;
- 4 - pico da onda;
- 5 - fim do sinal elétrico.

No sinal óptico, conforme já mencionado, temos o som da tecla que dispara a aquisição do sinal eletro-fisiológico, e zerando-se o relógio do vídeo têm-se os mesmos instantes do sinal elétrico na onda óptica.

Em alguns experimentos, como na aplicação de propanol, por exemplo, o sinal óptico é muito fraco, e outros tipos de processamento foram feitos, como a subtração de quadros consecutivos, para que a onda ficasse visível. Com este protocolo de aquisição do sinal óptico é possível obter ainda a velocidade da onda analisada, pois com o aumento de 16 vezes no microscópio, 150 pixels na imagem digitalizada correspondem a 1mm na retina, e o tempo é marcado de acordo com o sinal elétrico. Outra forma de medir a velocidade é manualmente, com um cronômetro, durante a edição do registro da onda em vídeo através de um monitor com a tela marcada no tamanho relativo da retina. Comparando as velocidades obtidas nos dois métodos, a diferença é quase nula.

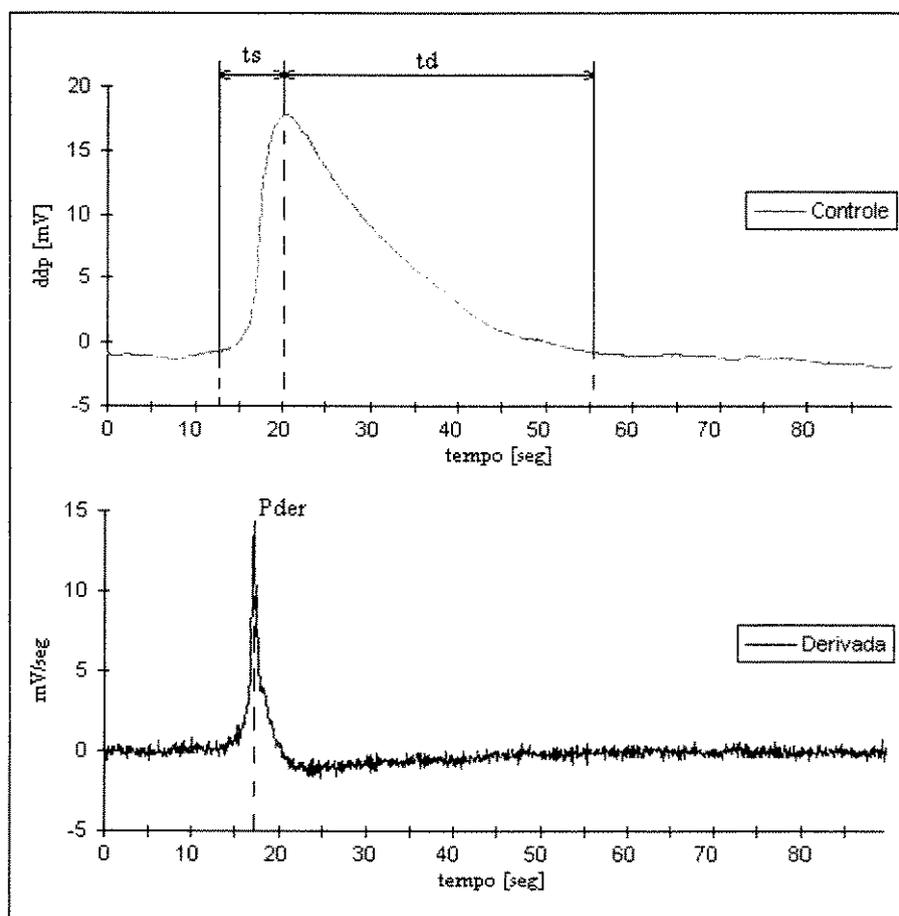


Figura 3.2 - Exemplo de onda com as medidas feitas na análise do sinal elétrico.

Na primeira aquisição, a ponta do micro-eletrodo é localizada com a ajuda de um mapeamento dos tons de cinza originais para 128 níveis. Este passo é relevante na medida em que determina o tamanho da área de sensibilidade do micro-eletrodo, além de delimitar a faixa da imagem que nos interessa. Em todas as figuras adquiridas, marca-se a frente de onda, e a partir daí mede-se a distância (em pixels e em milímetros) da ponta da micro-pipeta à onda, e corta-se uma faixa englobando as duas. Faz-se então a densitometria desta faixa, através da média vertical de toda a sua largura, e obtém-se assim o perfil óptico da onda, que é mapeado para 256 níveis de cinza, e gravado em arquivo texto. Um exemplo de faixa e do perfil de brilhância obtido estão na figura 3.3. Aqui, a ponta do micro-eletrodo está posicionada no pixel 298, e é marcada tanto na faixa quanto no gráfico. Este perfil foi obtido 33 segundos depois do início da gravação do sinal elétrico, quando a onda já havia passado pelo micro-eletrodo (ela se dirige para a direita).

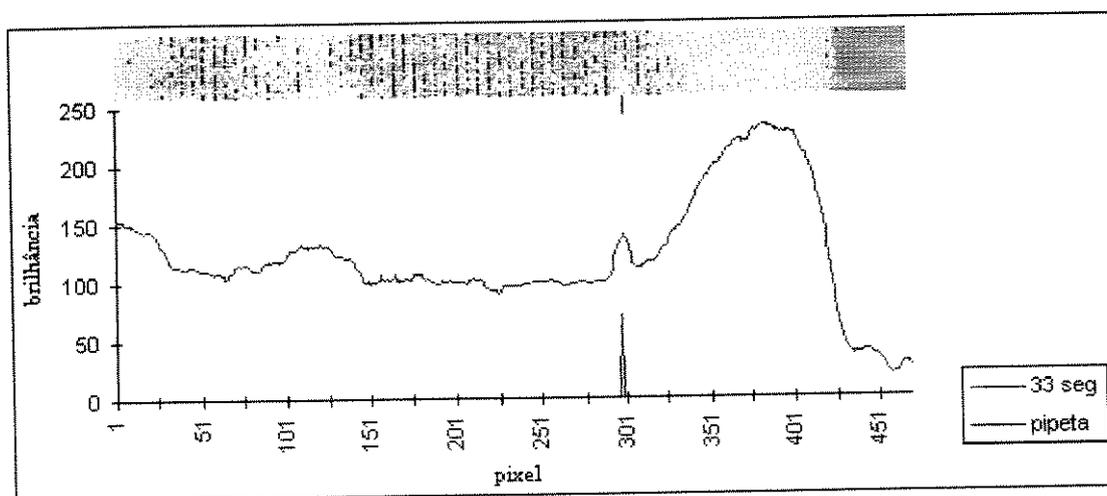


Figura 3.3 - Exemplo de obtenção do perfil óptico de uma onda (nível 0 corresponde à cor preta, e 255 à branca).

As faixas relativas a imagens de uma mesma onda são transportadas para uma só figura. Nos experimentos em que o sinal óptico é fraco, este procedimento não é seguido, mas imagens inteiras são gravadas, em geral mapeadas para o aumento do contraste.

Para a edição das ondas (perfil elétrico e óptico) utiliza-se o *software* EXCEL 5.0 ou o MATLAB. O pacote SEMPER6P exporta imagens em padrão próprio, que não é reconhecido pelos *softwares* usuais para Windows (PaintBrush, PaintShopPro, CorelDraw, etc). Por isso, utiliza-se o *freeware* TNIMAGE, que possibilita a leitura de qualquer imagem da qual se saiba apenas o tamanho em *pixels*.

A partir do TNIMAGE, exporta-se a imagem de forma que seja reconhecida por outros pacotes (com extensão pcx, gif ou tif)¹.

Para a análise estatística foram utilizados os *softwares* MINITAB e EXCEL 5.0. Foram aplicados os testes usuais de variância (ANOVA) e avaliados os coeficientes de correlação entre todas as variáveis medidas, para cada conjunto de experimentos. Foi utilizada a distribuição *t* de Student para todas as análises, porque na grande maioria dos conjuntos experimentais o número de amostras é menor do que onze. Além disso, admitiu-se o intervalo de confiança de 95%. A fórmula para a média, neste caso, é a usual, e para o desvio (*sd*) é:

$sd_t = t_{0,025} \cdot \frac{sd}{\sqrt{n}}$, onde *sd* é o desvio padrão calculado para a amostra de tamanho *n*, e $t_{0,025}$ é o valor crítico de *t* para *n-1* graus de liberdade com $p < 0,05$. Para a avaliação do efeito de drogas, os dados foram normalizados em termos de porcentagem dos valores das ondas controle de cada experimento.

3.2.2. Implementação dos modelos

Para mostrar a viabilidade dos modelos propostos, foi feita a implementação dos dois modelos já mencionados, sendo que aquele baseado em autômatos celulares foi desenvolvido no *software* MATHEMATICA (versão 2.2), pois este pacote possui funções de manipulação de matrizes e animação de imagens que facilitam a programação no caso do autômato celular². Para o modelo feito a partir da equação de reação-difusão e dos processos celulares admitidos como válidos para a DA, utilizou-se a linguagem C (Turbo C 2.0), devido à grande quantidade de cálculos intermediários necessária.

A validação dos modelos foi feita através da análise da comparação qualitativa com o sistema biológico. Isto significa que foram testadas, durante as simulações, condições experimentais cujos resultados são conhecidos, e avaliados os efeitos obtidos nos dois programas. Com o modelo baseados em autômatos celulares, os comportamentos testados foram a onda solitária, a colisão entre ondas (elicitadas em extremidades opostas), a propagação em torno de barreiras e a ocorrência de espirais. Na equação de reação-difusão foi

¹ A resolução obtida pelo *software* utilizado na edição é pior do que a do TNIMAGE, e por isso notam-se mais detalhes no perfil do que na faixa (como se pode observar na figura 3.3).

² O MATHEMATICA é um produto da Wolfram Research Inc., que pertence a Stephen Wolfram, um dos mais ativos pesquisadores na área de autômatos celulares.

também testada a onda solitária, além da alteração do valor da constante de difusividade extracelular para o potássio e a inibição dos canais e bombas de potássio da glia, simulando manipulações experimentais (farmacológicas ou fisico-químicas) feitas através da perfusão. Depois da validação foram feitas alterações nos modelos de forma a verificar outros comportamentos de conjunto.

A representação gráfica nos dois modelos foi feita inicialmente em matrizes cujos valores numéricos são convertidos em cores. No modelo baseado em autômatos celulares, todos os comportamentos podem ser identificados utilizando-se níveis de cinza, que representam o estado da célula. No modelo feito a partir das equações de reação-difusão, algumas das simulações são apresentadas em matrizes coloridas, mas muitas delas foram avaliadas pelos valores numéricos da concentração de potássio ou do potencial de membrana na glia ou terminais sinápticos. Sendo assim, neste tipo de resultado os valores numéricos são exportados para um arquivo de dados (**.dat**) e posteriormente analisados com o *software* EXCEL 5.0 ou GraphPadPrism 2.0.

4. Resultados experimentais e computacionais

Neste item apresentamos os resultados experimentais e aqueles obtidos com os modelos propostos. Para melhor clareza, os resultados das análises estatísticas (tabelas e alguns gráficos) são mostradas no apêndice 2. Todos os resultados obtidos são descritos a seguir.

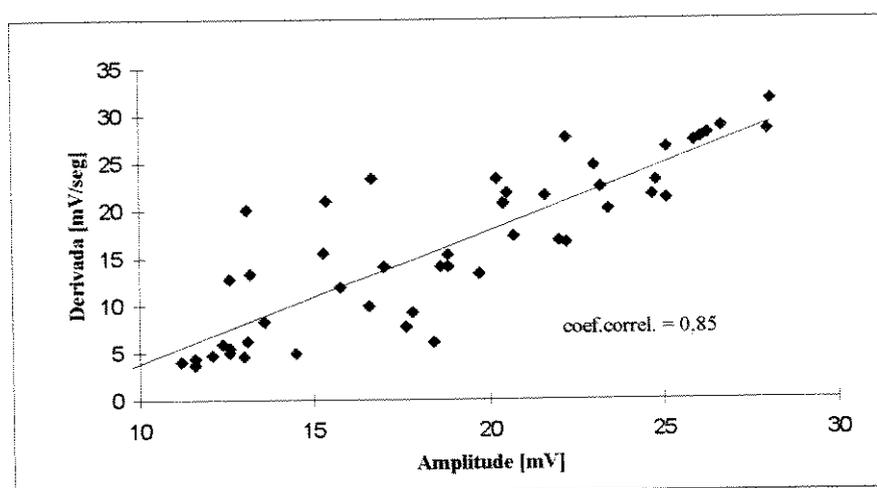
4.1. Resultados Experimentais

De acordo com o protocolo descrito no capítulo anterior, apenas as ondas que se enquadram nos parâmetros mencionados (com relação à temperatura, taxa de perfusão, tempo de descanso, etc) são consideradas válidas, e incluídas nos resultados apresentados aqui.

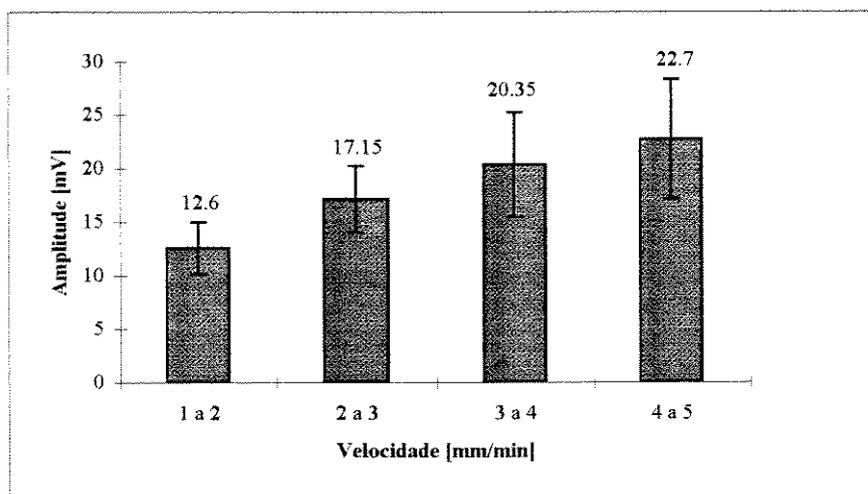
Nas ondas controle, a amplitude média das 51 ondas analisadas é 19 ± 1 mV ($p < 0,05$), e a velocidade encontrada é de $3,4 \pm 0,2$ mm/min ($p < 0,05$). Estes dois resultados estão de acordo com valores mencionados na literatura, que são 20mV para a amplitude e 3mm/min para a velocidade (Martins-Ferreira, 1983). Outros parâmetros também medidos são: a duração da onda eletro-fisiológica, em segundos (ver figura 3.2), de 47 ± 15 ; o tempo entre o pico da derivada e o pico da onda elétrica, de $3,2 \pm 0,9$ seg, e o valor médio do pico da derivada do sinal elétrico, de 17 ± 8 mV/seg. A figura 4.1 apresenta as relações entre amplitude e valor de pico da derivada, cujo coeficiente de correlação linear é de 85%, apesar da dispersão. A relação entre velocidade e amplitude é mostrada na parte **b** da mesma figura. Dividindo as ondas controle em quatro classes, com relação à velocidade, nota-se o aumento da amplitude proporcionalmente ao aumento de velocidade, mesmo considerando os desvios.

Como a análise dos resultados é feita pela comparação entre diversas retinas, não basta garantir o mesmo protocolo em todos os experimentos, é necessário mostrar que estatisticamente é lícito comparar retinas diferentes. Para isso, utilizamos a análise de variância (ANOVA) de dois fatores. A ANOVA rejeita os dados quando consideram-se retinas com número de ondas muito diferentes entre si. Assim, como é razoável admitir a influência do tempo de forma similar em todas as experiências, obtêm-se resultados satisfatórios com a ANOVA aplicada a subconjuntos de três, quatro ou cinco retinas que apresentem número de ondas aproximadamente igual. No apêndice 2 (tabela A2.1) mostramos a tabela completa dos valores do pico da derivada da onda de potencial referentes às ondas controle de três experimentos. Para $\alpha = 0,05$ (valor usual), obtemos $F = 0,57$ entre colunas, muito abaixo do

F_{critico} (3,74), e podemos então comparar as retinas entre si. Aplicamos a ANOVA às ondas controle pelo maior número de dados disponíveis, e pela natureza dos experimentos realizados (em todos os grupos experimentais foram obtidas ondas controle). Além disso, foi escolhido o parâmetro “pico da derivada do sinal eletrofisiológico” porque este é um fator numérico retirado diretamente do cálculo feito pelo *software*, além de apresentar os maiores desvios dentre os dados adquiridos (ver tabela 4.1). Não se trata aqui de generalizar a possibilidade de comparação entre retinas, mas sim de fundamentar os resultados analisados no decorrer deste capítulo.



(a)



(b)

Figura 4.1 - Relações entre amplitude, derivada e velocidade.

Conforme anteriormente descrito, o método para determinar a posição da ponta do micro-eletrodo é visual, ou seja, a cada experimento marca-se, na imagem já processada da

onda, o local aproximado da ponta. Isso significa que eventualmente não se obtém a posição exata da ponta da micro-pipeta. Mesmo assim, após diversas aquisições de imagens e comparações com os perfis eletro-fisiológicos verifica-se que, para todas as ondas (controle e sob o efeito de drogas), no momento em que ocorre o pico da derivada do sinal elétrico a onda óptica está localizada exatamente na ponta da micro-pipeta. Na figura 4.2, relativa ao experimento com propranolol, tal fato pode ser claramente observado (nos instantes 11,1 e 15,7, respectivamente), pois neste exemplo a ponta do eletrodo aparece nas faixas mostradas. Ressaltamos que os instantes de tempo referentes ao pico da derivada são obtidos a partir do perfil eletro-fisiológico. Nos perfis ópticos das figuras 4.19 e 4.20 observa-se a mesma relação espaço-temporal. Vale ainda notar que este tipo de comparação só é possível devido à aquisição dos dois sinais sincronamente.

Outro resultado comum a todos os experimentos, obtido pela comparação da evolução temporal dos dois sinais, é que a onda elétrica é detectada pelo eletrodo antes que o sinal óptico o atinja, como atestam quaisquer dos perfis de brilhância mostrados nas páginas seguintes. Isto decorre do fato de o eletrodo ter sensibilidade espacial para uma grande região à sua volta, enquanto que no caso do sinal óptico a retina pode ser interpretada como contendo eletrodos ópticos, cada um de alcance espacial infinitesimal, de forma que indique apenas as alterações de refratividade da luz nele próprio. Assim, antes de o sinal óptico atingir o eletrodo, este já indica alterações no nível de tensão do meio extra-celular. Este resultado corrobora a hipótese da sensibilidade espacial esférica para o micro-eletrodo. Além disso, quando a frente da onda óptica sai da região visível do quadro, na grande maioria das vezes o sinal elétrico ainda não voltou à linha de base.

Apesar de todos os parâmetros mencionados acima terem sido medidos nos experimentos com a aplicação de drogas, devido ao seu alto desvio dentro de cada grupo experimental não é possível fazer uma análise estatística adequada. Além disso, estes parâmetros não são comumente medidos, e por isso não dispomos de valores comparativos a partir de dados da literatura. Apresentamos no apêndice (tabela A2.2) uma tabela com as médias normalizadas e respectivos desvios de todos os dados analisados. Nos gráficos do apêndice 2 (figuras A2.1 a A2.9) apresentamos alguns dos conjuntos de dados da tabela A2.2 combinados entre si, com seus respectivos coeficientes de correlação e retas que aproximam uma relação linear entre eles. Foram escolhidos os parâmetros que apresentam maiores

coeficientes de correlação. Contudo, ainda observa-se a alta dispersão nos gráficos, o que é previsível pelos resultados da ANOVA quando aplicada a todas as retinas.

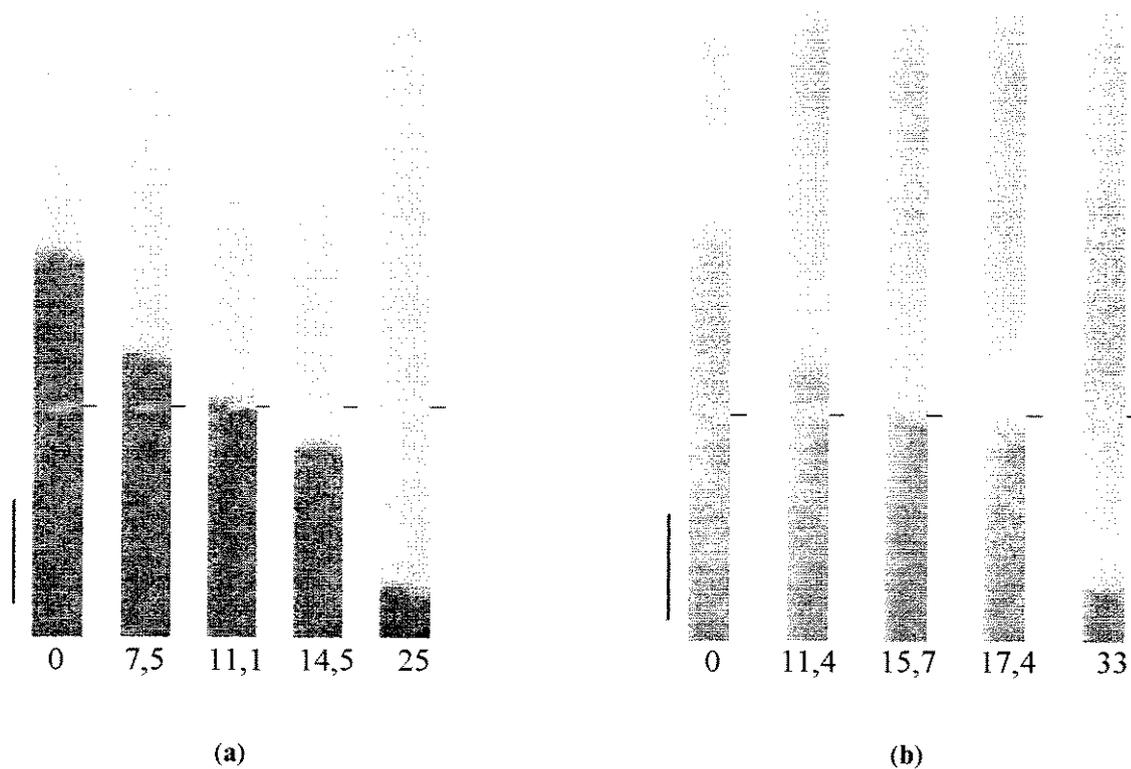


Figura 4.2 - Faixas retiradas do sinal intrínseco óptico. Números em segundos. A marca à esquerda indica 0,5mm. (a) Onda controle. Dados relativos ao perfil elétrico: início da aquisição (0), início da subida do sinal elétrico (7,5), pico da derivada (11,1), pico da onda (14,5). A 25 seg: onda óptica atinge o fim da região visível. (b) Onda sob o efeito de propranolol, a 500 μ M. Os números correspondem aos mesmos eventos descritos na parte (a).

Um resumo dos resultados considerados mais relevantes está na tabela 4.1 a seguir, em que se tem a amplitude, pico da derivada e velocidade normalizadas para cada conjunto de experimentos. Reiteramos que os dois primeiros conjuntos de dados são retirados do sinal eletro-fisiológico, enquanto a velocidade é medida pelo sinal óptico. Estes dados são comentados nos itens seguintes.

Produto	n	Amplitude		Derivada		Velocidade	
		% controle	95%	% controle	95%	% controle	95%
Barbitúrico	7	111	28	146	80	118	32
Bário	10	39	11	31	17	68	19
Glicerol	11	45	15	67	42	-	-
Propanol	12	39	16	40	20	92	11
Propranolol	10	48	22	38	19	83	19
Cloreto de Sódio	4	40	10	23	6	66	6

Tabela 4.1- Resumo dos resultados experimentais. A amplitude e derivada se referem ao perfil eletro-fisiológico, e a velocidade foi medida no sinal óptico (veja texto acima). Os desvios são dados para um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$)

4.1.1. Barbitúrico

Aqui utilizamos o sódio-barbital, cuja estrutura molecular encontra-se na figura A2.10 (no apêndice 2). O mesmo barbitúrico já foi usado anteriormente (Wiedemann, 1995), onde a sua influência sobre a velocidade da DA é analisada para várias concentrações dessa droga. Naquele trabalho, verifica-se que a concentração mais eficaz é a de $500\mu\text{M}$, obtendo-se 20% de aumento na velocidade. Como se pode observar pela tabela 4.1, obtemos 18% de aumento no caso da velocidade ($n = 7$), enquanto a amplitude tem um acréscimo de 11%. Estes dois resultados têm índice de correlação linear de 90% (veja a figura A2.2), e por isso podemos compará-los, ou seja, para um aumento de 11% na amplitude de ondas sob o efeito de sódio-barbital pode-se prever um aumento de 18% na sua velocidade. Outras comparações também são válidas, como entre o valor da derivada e o intervalo de tempo entre o pico da derivada e o pico da onda, cujo coeficiente de correlação é de $-0,99$, ou entre a velocidade e o valor do pico da derivada (figura A2.3).

A figura 4.3 apresenta dois perfis eletro-fisiológicos com suas respectivas amplitudes. O perfil óptico de uma onda controle e de uma onda obtida após a aplicação do barbitúrico, no mesmo experimento, é mostrado nas figuras 4.4 e 4.5. Quase não há alteração entre os dois perfis de brilhância. A forma do sinal elétrico também é preservada.

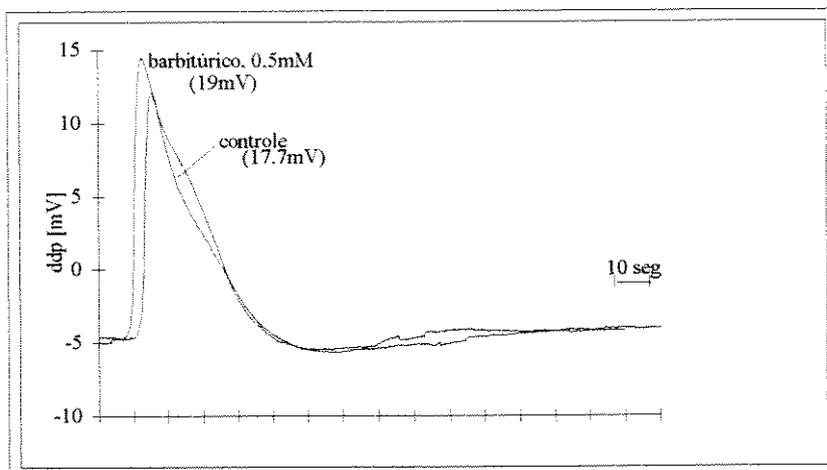
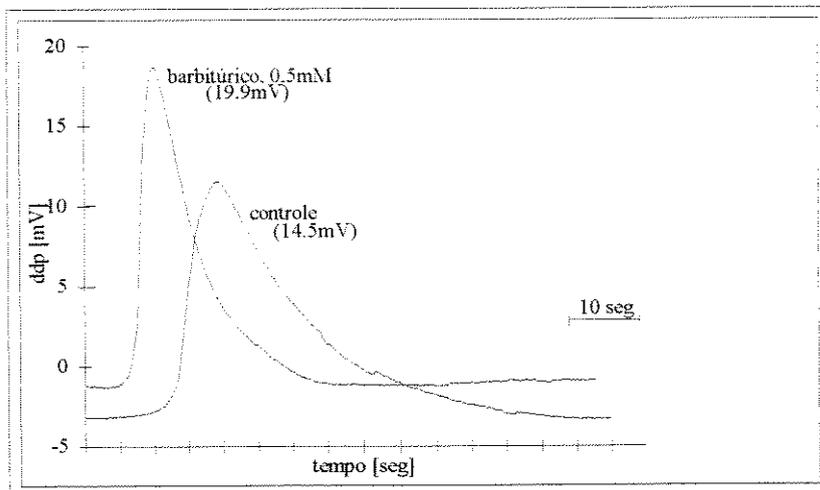


Figura 4.3 - Sinal eletro-fisiológico. Dois exemplos de onda controle e sob o efeito de sódio-barbital. As amplitudes são indicadas entre parêntesis.

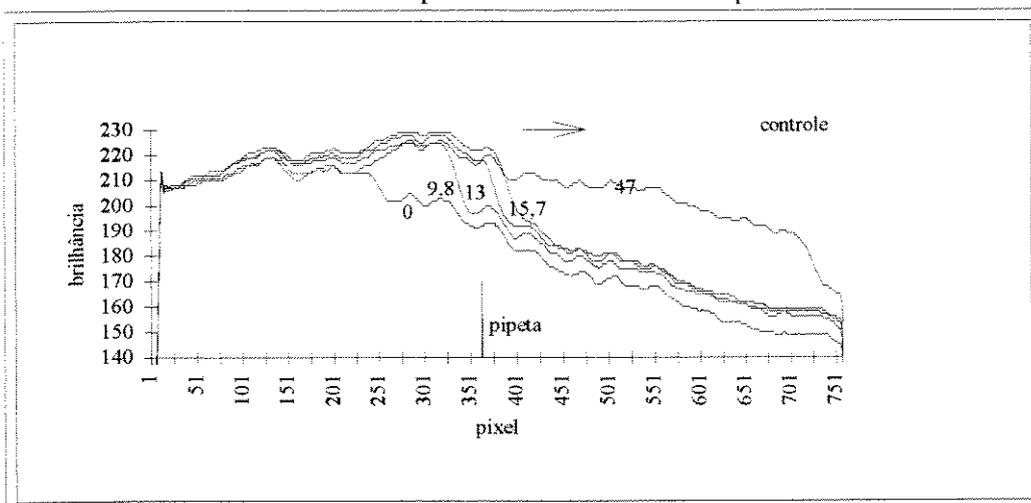


Figura 4.4- Perfil de brilho - onda controle (referente à onda da parte b da figura acima). Os números são dados em segundos, e referem-se a parâmetros extraídos do sinal eletro-fisiológico: início da aquisição (0); início da onda elétrica (9,8); pico da derivada (13,2); pico da onda (15,7). A 47 seg a onda óptica atinge o fim da região visível na tela (o fim da onda elétrica acontece a 51,8 seg).

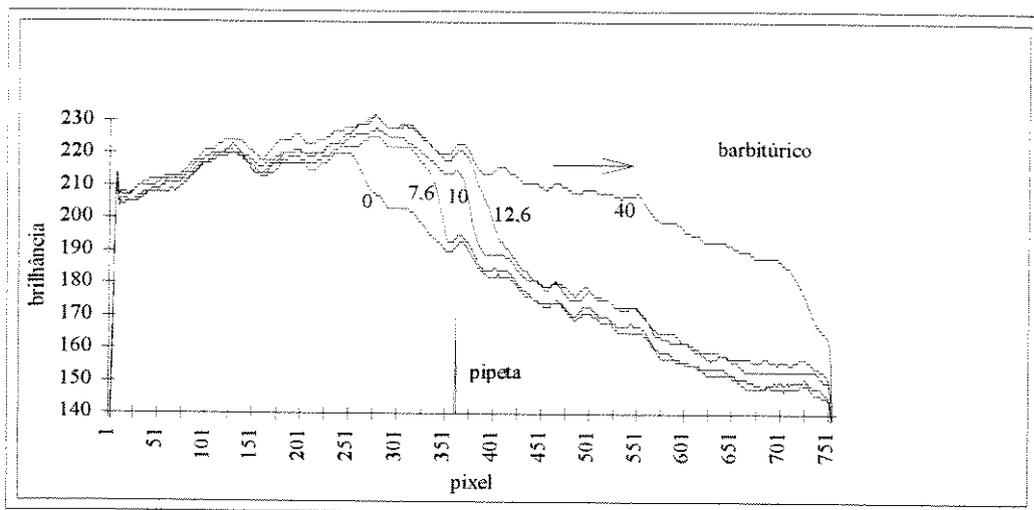


Figura 4.5 - Perfil de brilhância - efeito do sódio-barbitálio. (A seqüência de números é como na figura 4.4).

4.1.2. Bário

Dentre dezessete ondas adquiridas durante a perfusão com cloreto de bário, sete apresentaram a depressão completa da onda de potencial extracelular. Nas restantes o efeito depressivo foi parcial (figura 4.6). Tomando estas 10 ondas, em média há uma depressão de 61% com relação à amplitude das ondas controle. O pico da derivada deste sinal é ainda mais afetado, sendo deprimido para 31% dos controles. O índice de correlação linear entre estas duas variáveis é de 91% (para $n=10$), como mostra a figura A2.4. A alteração da forma de onda mostrada na figura (interrupção da subida) não foi observada nos outros experimentos com cloreto de bário.

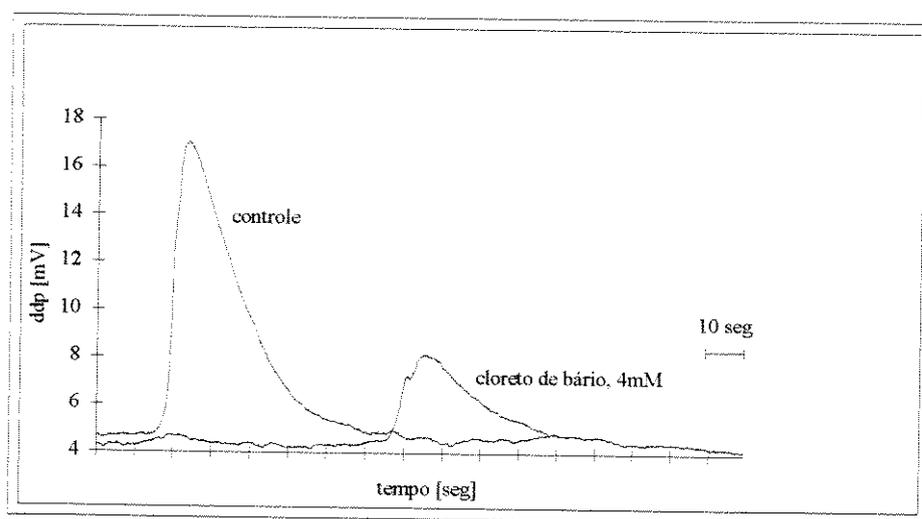


Figura 4.6- Experimento com cloreto de bário. Sinal elétrico.

Apesar da influência sobre o perfil elétrico, o cloreto de bário afeta pouco o IOS sob o ponto de vista de brilhância, o que pode ser observado nas figuras 4.7 e 4.8. Entretanto, a velocidade da onda diminui sensivelmente, para 68% da controle, como se pode notar nas figuras 4.9 e 4.10 a seguir. Com a subtração de quadros consecutivos (como descrito no capítulo 3), é possível divisar o quanto a onda se desloca no intervalo considerado. A faixa branca indica a propagação da onda ou, mais especificamente, o deslocamento da frente de onda.

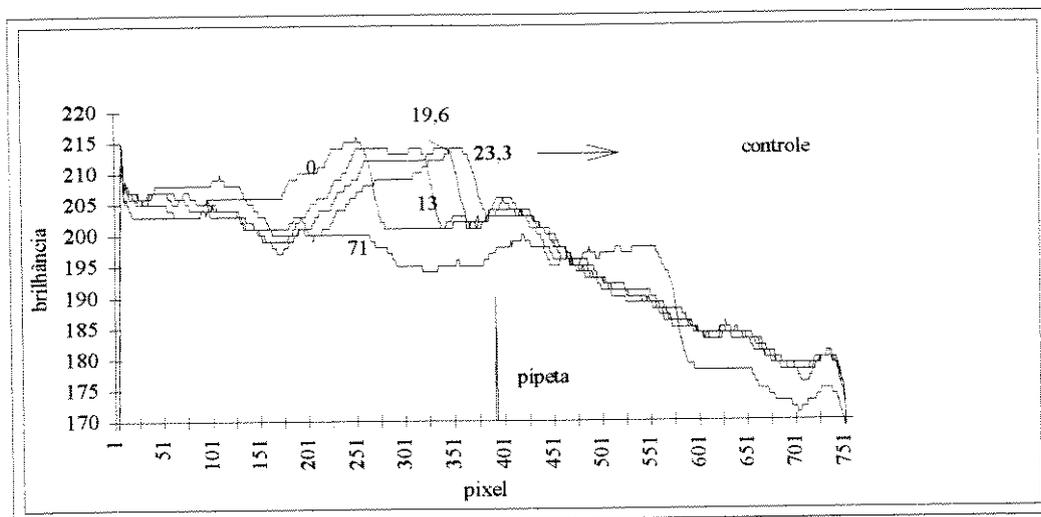


Figura 4.7- Perfil óptico da onda controle da figura acima. (A seqüência de números é como na figura 4.4.)

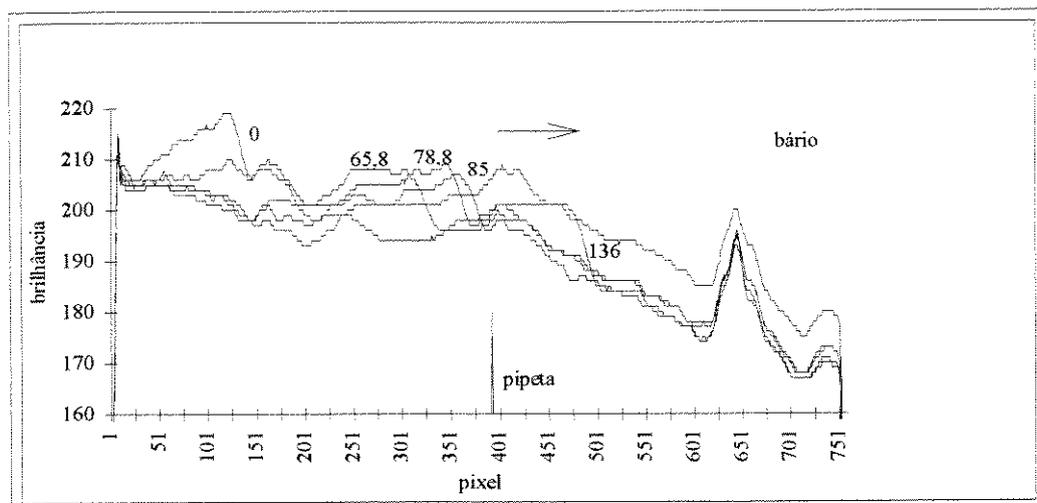


Figura 4.8- Perfil óptico da onda sob o efeito de bário mostrada na figura 4.6. (A seqüência de números é como na figura 4.4.)

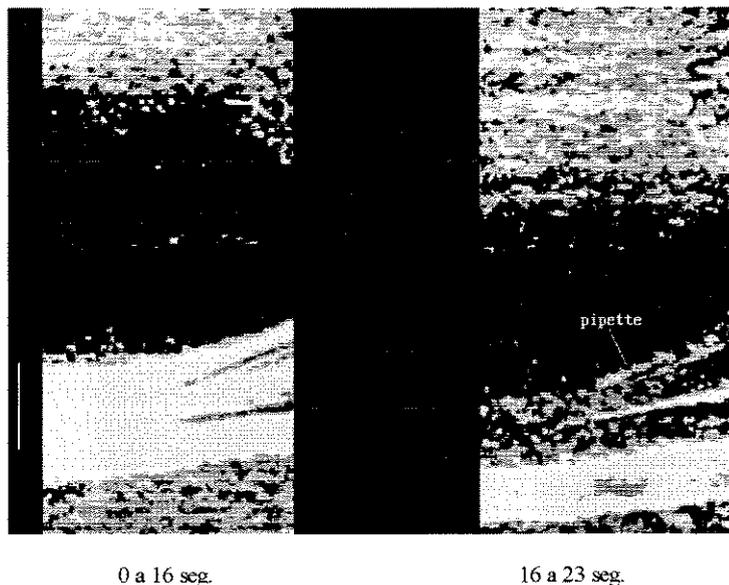


Figura 4.9 - Exemplo de onda controle, diferenças entre dois quadros. A marca vertical à esquerda indica 0,5 mm.

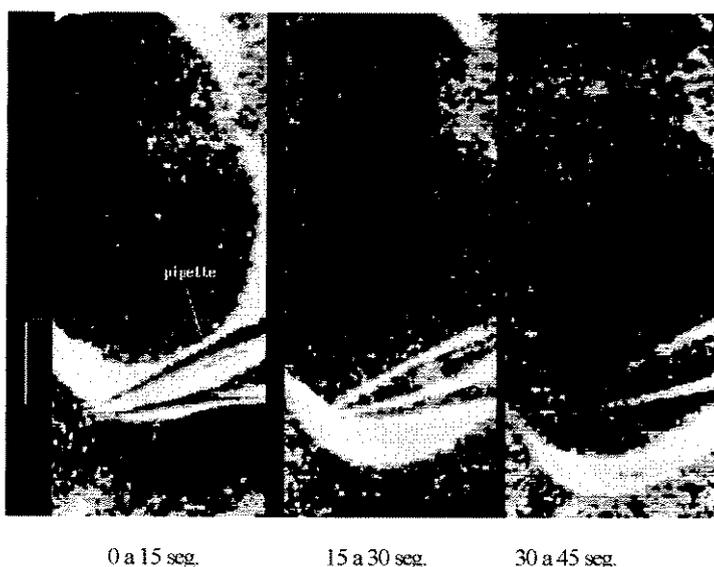


Figura 4.10 - Exemplo de onda sob o efeito de bário. Diferença entre quadros tomados nos instantes marcados abaixo de cada faixa. A marca à esquerda indica 0,5mm.

4.1.3. Glicerol

Na perfusão com glicerol durante a propagação da DA o sinal óptico fica completamente deprimido. Este comportamento é verificado em todas as ondas adquiridas sob o efeito de glicerol (n = 11). A figura 4.12 mostra ainda alguma alteração nos níveis de brilhância do fundo da retina, mas nem mesmo com subtração de quadros consecutivos ou outros tipos de tratamento de imagem é possível identificar a onda. A figura 4.13 mostra uma onda controle do mesmo experimento. Após a perfusão com glicerol, a recuperação da retina é extremamente

lenta. No experimento mostrado, a onda controle foi obtida após 130 minutos do início da lavagem com solução de Ringer (e 150 minutos após a onda da figura 4.12), e por isso há uma grande diferença entre os brilhos de fundo das duas imagens e uma baixa amplitude óptica no perfil (controle) apresentado.

As onze ondas avaliadas apresentam dois picos no concomitante elétrico, contrariamente às ondas controle, como exemplificado na figura 4.11. Considera-se o maior pico do sinal elétrico, subtraído do valor da linha de base para o cálculo da amplitude destas ondas. Em média, a amplitude é deprimida para 45% do valor das ondas controle. A correlação linear com o valor do pico da derivada é de 90% (cf. figura A2.6). Com relação à duração, não há alterações estatísticas significativas (ver tabela A2.2).

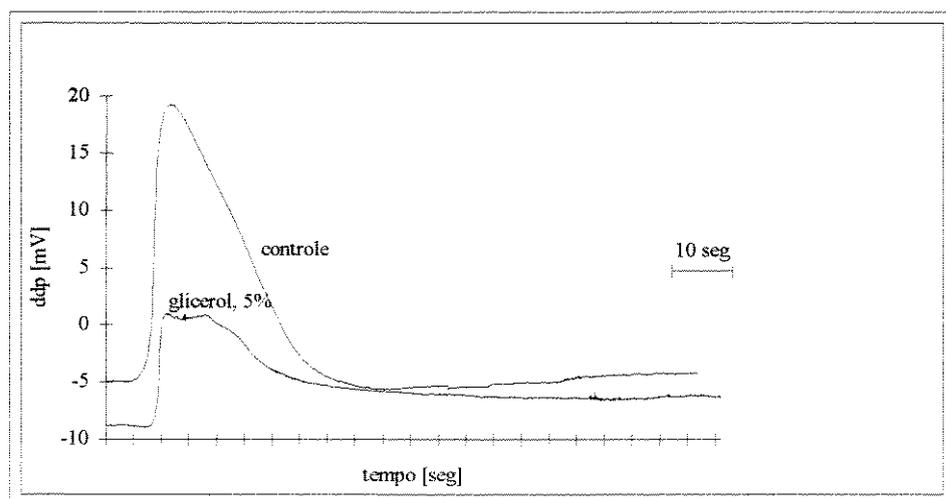


Figura 4.11- Sinal eletro-fisiológico - onda controle e sob o efeito de glicerol.

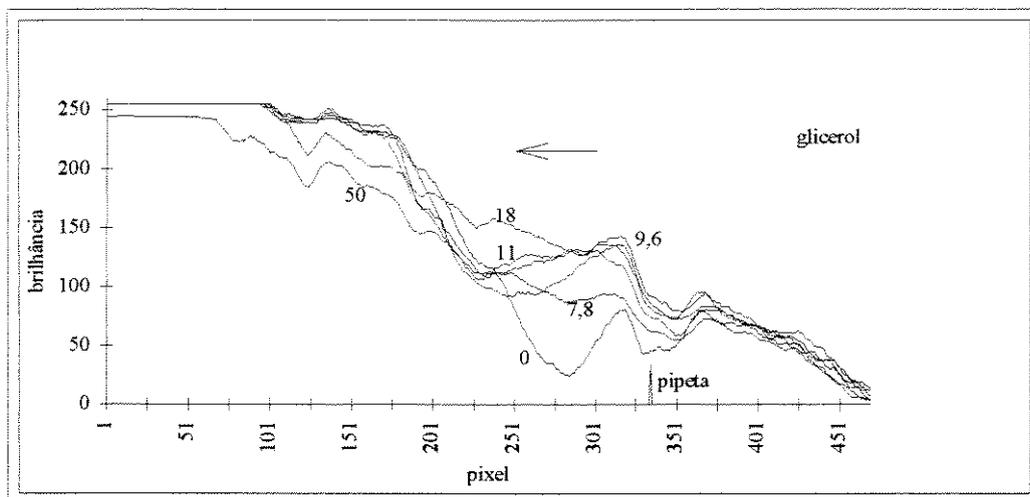


Figura 4.12- Perfil de brilhância referente à onda sob o efeito de glicerol, apresentada na figura acima.

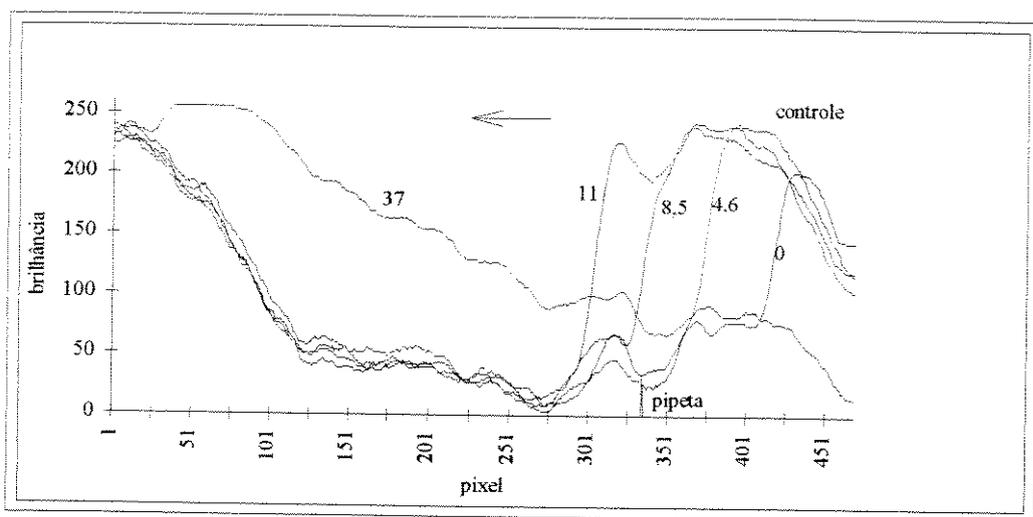


Figura 4.13- Perfil óptico da onda controle. (A seqüência de números é como na figura 4.4.)

4.1.4. Propanol

Considerando a amplitude do sinal elétrico, dentre as drogas testadas o propanol é a que apresenta a maior depressão. As ondas obtidas são em média 39% ($n = 12$) das ondas controle. O coeficiente de correlação linear ente este parâmetro e a derivada é de 84% (cf. figura A2.7).

Além do glicerol, propanol é a única droga que suprime completamente o IOS, como mostra a figura 4.15. Entretanto, contrariamente ao glicerol, a velocidade pode ser medida aplicando-se subtrações de quadros, e não há diferença estatística significativa entre estas ondas (após a aplicação de propanol) e os controles (veja tabela 4.1). A figura 4.17 mostra um exemplo de tratamento de imagem em que é possível visualizar a frente de onda. Neste exemplo são feitas duas subtrações entre os quadros digitalizados entre 0 e 2,4 seg e entre 2,4 e 10 seg, e posteriormente uma média dos níveis de cinza dos oito vizinhos de cada pixel (filtro passa-baixa digital). No segundo caso, apesar do maior intervalo, a frente de onda é menos visível devido ao movimento da retina (o que altera o fundo, e se perde em precisão e definição da frente de onda). A figura 4.16 apresenta o perfil de brilhância da onda controle referente à figura 4.14. Esta onda controle foi obtida após a lavagem da retina com solução de Ringer, depois da onda da figura 4.15, e mostra a recuperação do tecido.

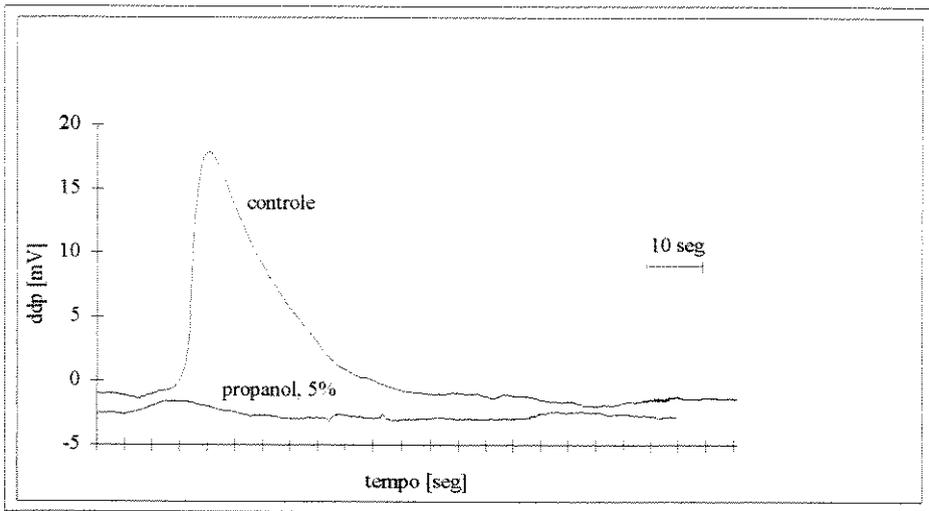


Figura 4.14- Sinal eletro-fisiológico - onda controle e sob o efeito de propranol.

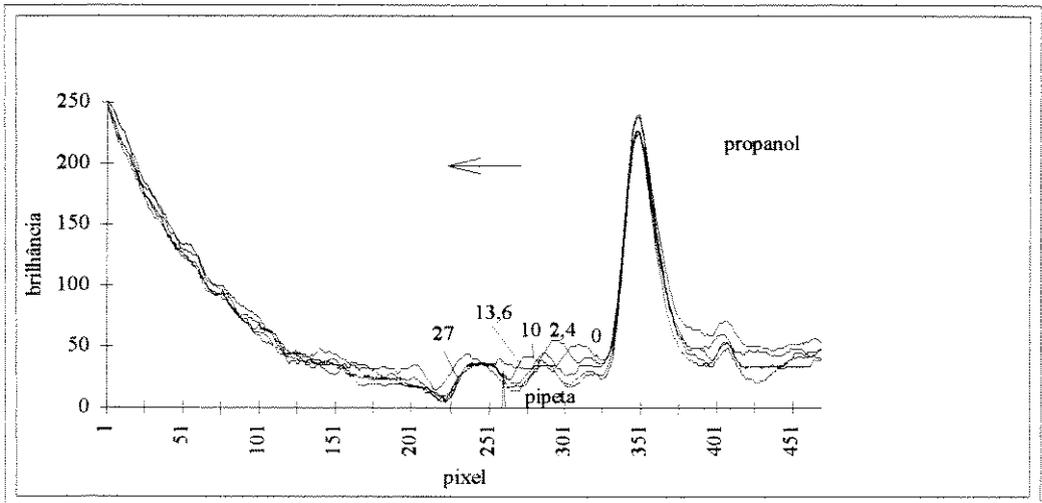


Figura 4.15- Perfil de brilhância referente à onda sob o efeito de propranol. cujo concomitante elétrico é apresentado na figura anterior. (A seqüência de números é como na figura 4.4.)

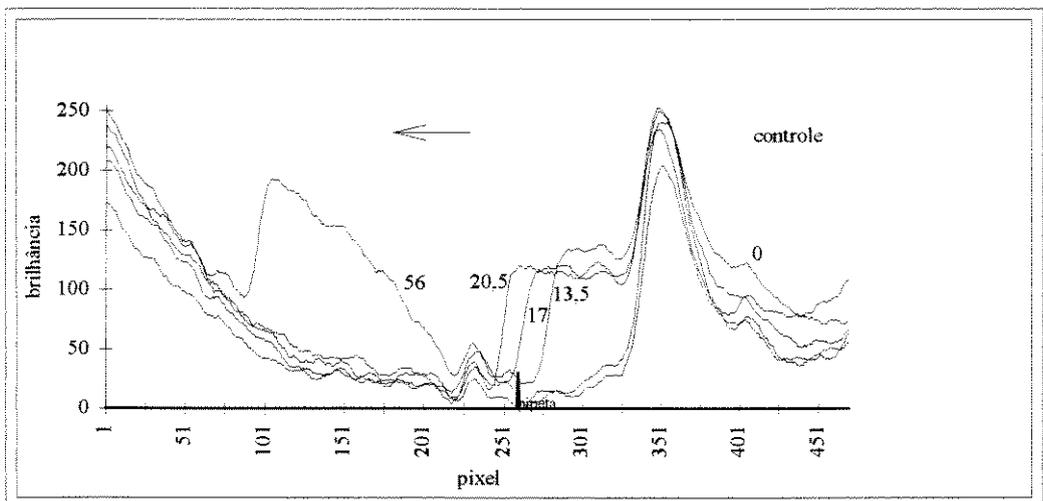
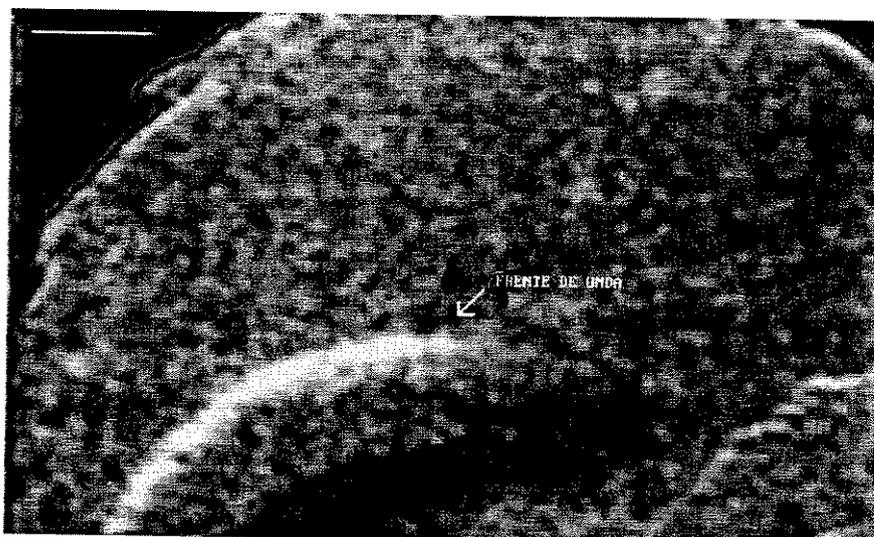
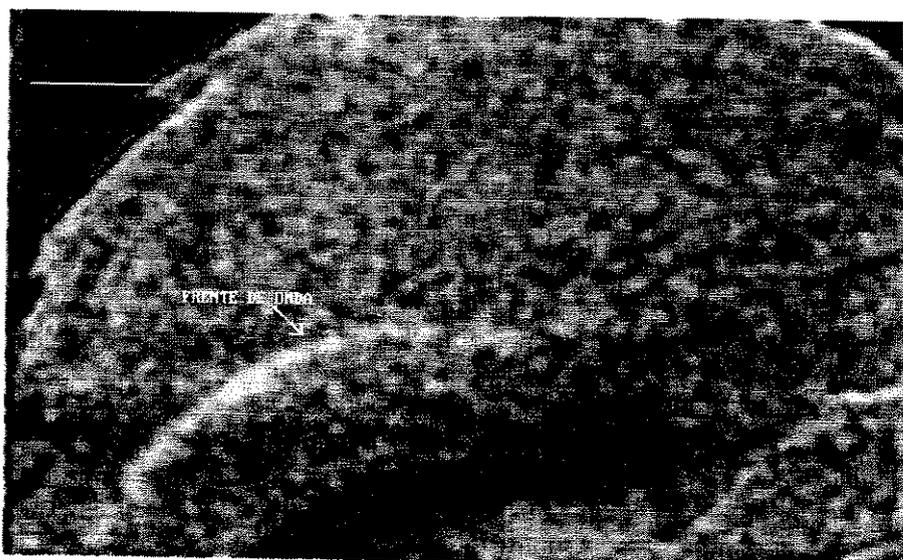


Figura 4.16- Perfil de brilhância referente à onda controle. (A seqüência de números é como na figura 4.4.)



(a)



(b)

Figura 4.17 - Onda obtida durante a perfusão com propranolol. Subtração dos quadros referentes aos instantes: (a) 0 e 2,4 seg e (b) 2,4 e 10 seg. O traço horizontal no canto superior esquerdo indica 1 mm.

4.1.5. Propranolol

Como mostrado na tabela A2.2, a duração do IOS é menor durante a aplicação de propranolol (a figura A2.11 apresenta a sua estrutura molecular). As figuras 4.19 e 4.20 mostram de forma mais clara esta alteração. Além disso, na maior parte das ondas a retina fica mais clara quando sob o efeito de propranolol, como se pode observar comparando os níveis de brilhância de fundo das duas figuras, em que não foi feito o mapeamento usual nos níveis de cinza, pois originalmente o sinal já apresenta níveis de cinza de 0 a 255.

Este grupo de experimentos é o único que permite a comparação dos níveis de brilhância com o sinal elétrico até o fim das duas ondas, já que nenhuma outra droga altera o perfil óptico

no sentido de diminuir a sua duração. Na figura 4.18 a duração da onda eletro-fisiológica é também menor do que a sua onda controle respectiva (ver tabela A2.2), e os 22 segundos do sinal elétrico coincidem exatamente com a duração do sinal óptico. Este fato não é verificado em todos os experimentos, dado que nem sempre a duração é tão curta

A amplitude do sinal eletro-fisiológico, nas dez ondas adquiridas, é deprimida em média para 48% dos controles, e o seu coeficiente de correlação com a derivada é de 96% (cf. fig. A2.9). O alto desvio (22%) se deve ao fato de que o tecido parece ser muito sensível ao tempo de aplicação do propranolol, de forma que uma onda obtida 20 min após o início da aplicação não poderia ser comparada com uma outra, obtida depois de 40 min de exposição.

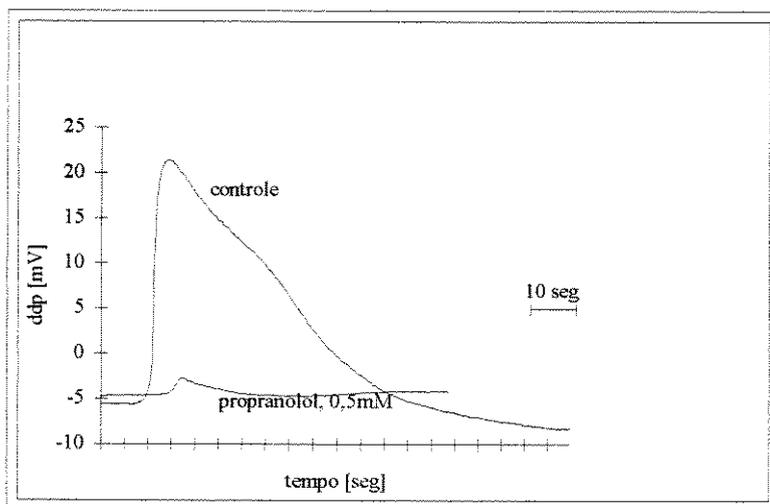


Figura 4.18- Sinal eletro-fisiológico - onda controle e sob o efeito de propranolol.

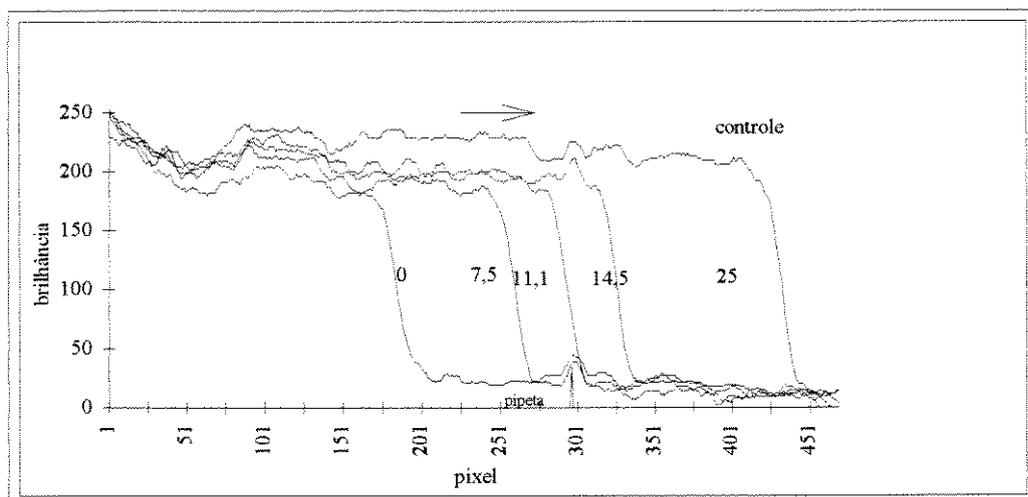


Figura 4.19- Perfil de brilho referente à onda controle apresentada na figura acima. (A numeração segue a figura 4.4.)

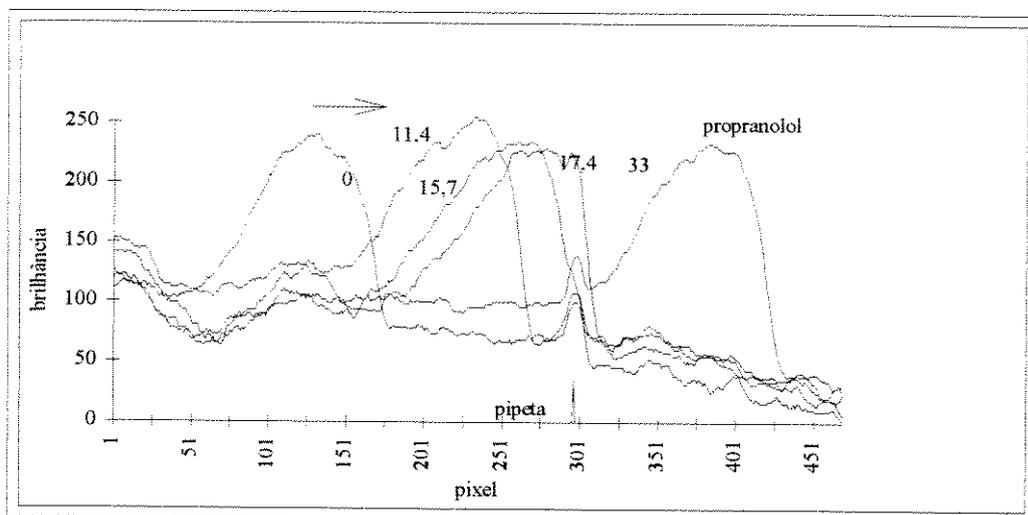


Figura 4.20- Perfil de brilho referente à onda sob o efeito de propranolol, cujo concomitante elétrico é apresentado na fig. 4.18. A numeração segue a fig. 4.4, com a exceção de que aqui o perfil óptico a 33 seg corresponde ao fim da onda eletro-fisiológica (veja texto acima).

4.1.6. Cloreto de Sódio

As figuras 4.22 e 4.23 mostram duas ondas, uma controle e uma sob o efeito do aumento da concentração de cloreto de sódio de 100 para 140 mM na perfusão. No perfil obtido a 47,3 seg (figura 4.23), é possível ver toda a onda óptica, entre os *pixels* 301 e 651, e notam-se claramente pelo menos dois picos neste perfil. Note que no caso de meio hiperosmolar o IOS é invertido. O primeiro deles pode ser visualizado nas outras ondas da mesma figura. Este fato não é comum nas ondas controle (cf. a figura 4.22), onde, apesar de haver variações nas brilhanças durante a propagação das ondas, nunca apresentam picos tão destacados ou, quando há dois picos, são distantes um do outro. É interessante notar também que o momento da ocorrência do último pico óptico coincide com o fim do sinal elétrico. O resultado mais comum é que quando acontece o fim da onda elétrica o IOS ainda não voltou aos valores de brilho de fundoda retina, ou seja, normalmente o IOS é mais prolongado do que o concomitante elétrico.

O objetivo dos experimentos com sódio é comparar o instante em que ocorre o pico da derivada com a localização espacial da onda invertida. Como nos outros experimentos, também aqui o sinal óptico (invertido) se encontra sobre a micro-pipeta (note o início do primeiro pico da onda a 14,5 seg da figura 4.23).

A amplitude do sinal eletro-fisiológico é deprimida em 60% (n=4), enquanto a velocidade é deprimida 34% sob o efeito de NaCl. Em média, a duração é 74% da duração das ondas controle.

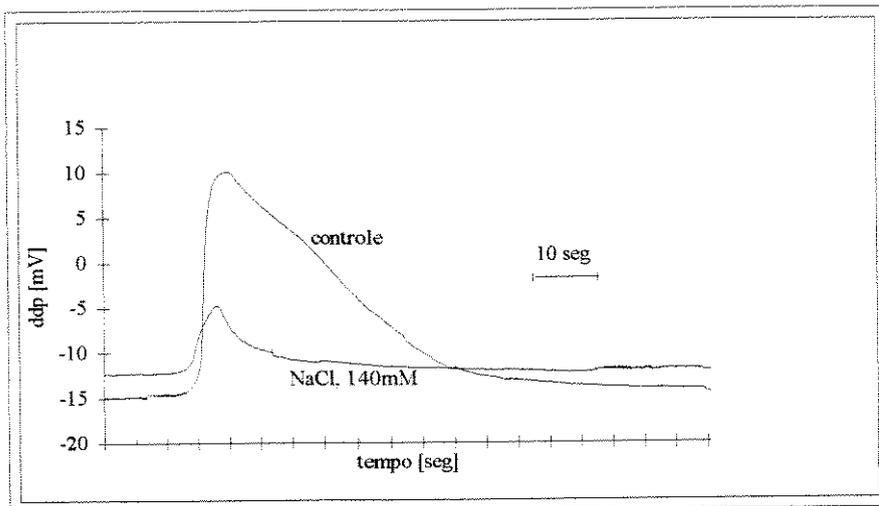


Figura 4.21- Sinal eletro-fisiológico - onda controle e sob o efeito de cloreto de sódio a 140mM.

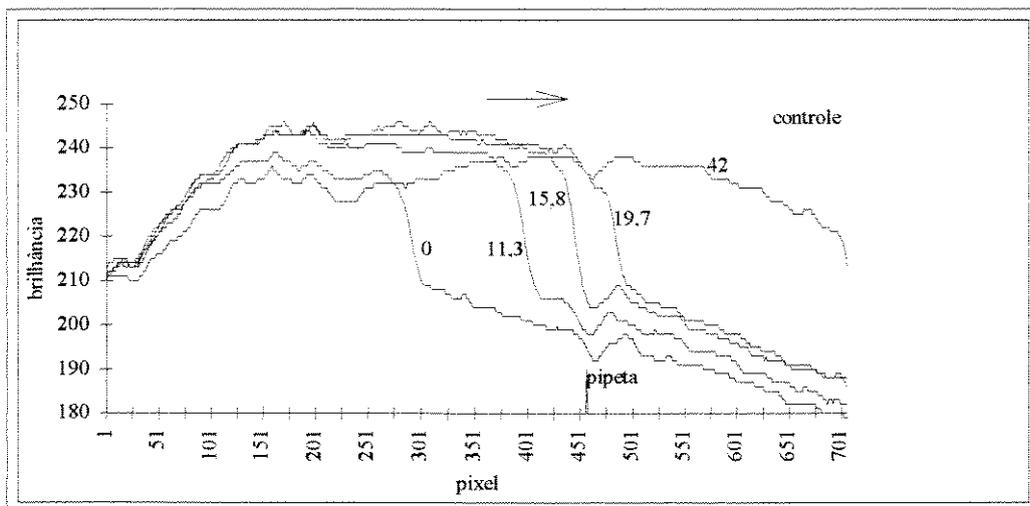


Figura 4.22- Perfil de brilhância referente à onda controle apresentada na figura 4.21. (A numeração segue a figura 4.4.)

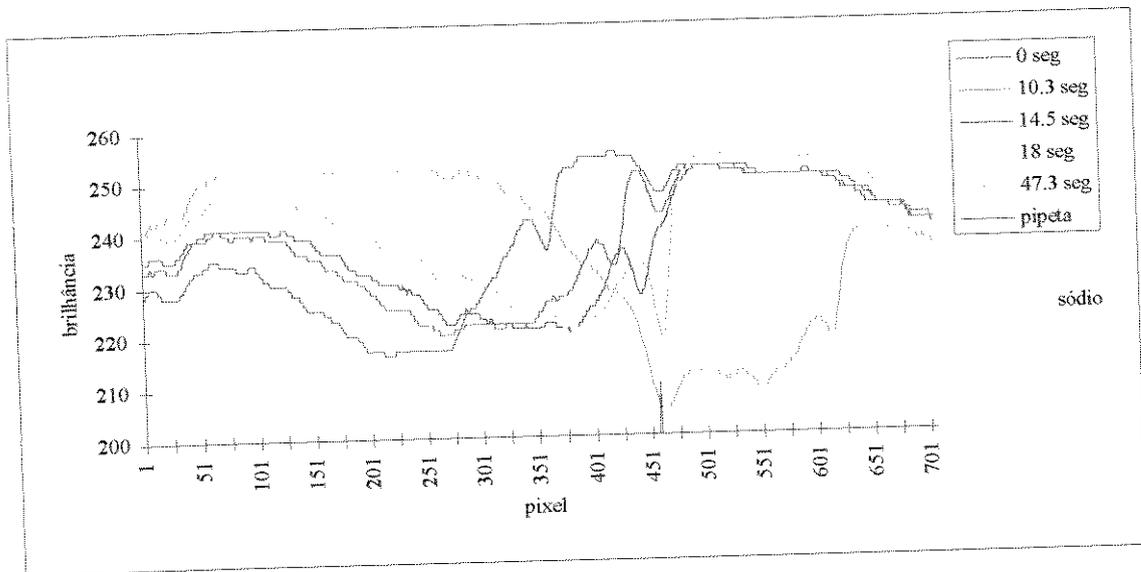


Figura 4.23- Perfil óptico referente à onda sob o efeito de cloreto de sódio, cujo concomitante elétrico é apresentado na fig. 4.21. (A numeração segue a figura 4.4.)

4.2. Autômatos Celulares

4.2.1. Descrição do modelo implementado

Foi implementado um CA euleriano (determinístico), em reticulado de ordem variável, bi-dimensional, com vizinhança de von Neumann modificada para ordem 11 e fronteiras absorventes. Nas simulações, a ordem do reticulado variou de 50 a 100. A forma de implementação foi feita de acordo com o texto (Fast e Efimov, 1991), onde se estuda a dependência da velocidade das ondas em função do intervalo de excitação³. A máquina de estados da figura a seguir mostra o funcionamento básico do CA e a relação entre os estados quiescente (**q**), excitado (**e**) e refratários, divididos em absolutos (**ra**) e relativos (**rr**). Admite-se um número variável de estados **ra** e **rr**, indicados na figura por **n** e **m**, respectivamente. Para que um elemento seja excitado (vá para o estado **e**), é necessário um estímulo (indicado por **est**) de qualquer amplitude se a célula está no estado quiescente, ou um estímulo acima do limiar (**th**), que é calculado para as células em estados refratários relativos.

³ o que é comumente chamado de relação de dispersão (Brand et al., 1997).

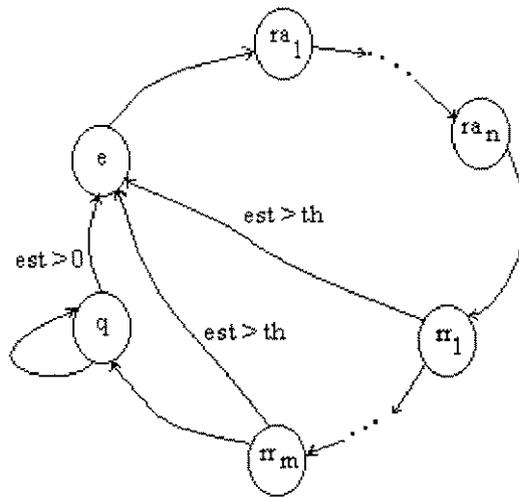


Figura 4.24 - Máquina de estados para o CA proposto.

Para o cálculo do limiar é usada uma equação de primeira ordem, decrescente, que cruza o eixo das ordenadas em $x = q$ (estado quiescente), isto é, quando a célula volta à quiescência, o limiar volta a zero.

Barreiras são definidas atribuindo valores numéricos (às células) maiores do que os estados refratários, e durante o cálculo da nova matriz de estados estas células não são alteradas. A cada geração (ou simulação) todos os elementos (n) do autômata são reavaliados, multiplicando-se elemento a elemento a matriz de pesos (\mathbf{W}) da figura 4.24 por uma matriz (\mathbf{E}) cujos elementos são 0's e 1's e que indica quais células estão excitadas na vizinhança do elemento que está sendo recalculado. Portanto, a matriz \mathbf{W} indica o grau de conectividade de cada elemento (n). Os pesos são números inteiros, variando de -10 a 10. Se o peso é negativo, a relação entre este elemento e a célula n (que está sendo reavaliada) é inibitória, e caso contrário é excitatória. Mais especificamente, o estímulo (est) a ser aplicado ao elemento n (do autômato) é dado por

$$est_{n_{k,t}} = \sum_{i,j} w_{i,j} \cdot e_{i,j} \quad , \quad i=k-5 \dots k+5 \quad , \quad j=t-5 \dots t+5$$

onde w e e são elementos das matrizes \mathbf{W} e \mathbf{E} .

O estímulo é comparado com o limiar calculado para aquele estado e, caso seja maior, a célula passa ao estado excitado (e) ou, caso contrário, passa ao próximo estado segundo a máquina de estados da figura 4.25.

0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0
0	0	1	2	3	3	3	2	1	0	0
0	1	3	4	5	5	5	4	3	1	0
0	2	4	6	7	8	7	6	4	2	0
1	3	5	7	9	10	9	7	5	3	1
1	3	5	8	10	0	10	8	5	3	1
1	3	5	7	9	10	9	7	5	3	1
0	2	4	6	7	8	7	6	4	2	0
0	1	3	4	5	5	5	4	3	1	0
0	0	1	2	3	3	3	2	1	0	0
0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0

Figura 4.25 - Matriz de pesos (W) para o cálculo do estímulo de cada célula no autômato celular.

4.2.2. Teste de validação e simulações

Com a máquina de estados apresentada, ondas solitárias são facilmente obtidas, como mostra a figura 4.26. Conforme as exigências das características a serem observadas nas simulações, a máquina de estados foi modificada no sentido de incluir novos comportamentos, sem alterar as relações já presentes anteriormente.

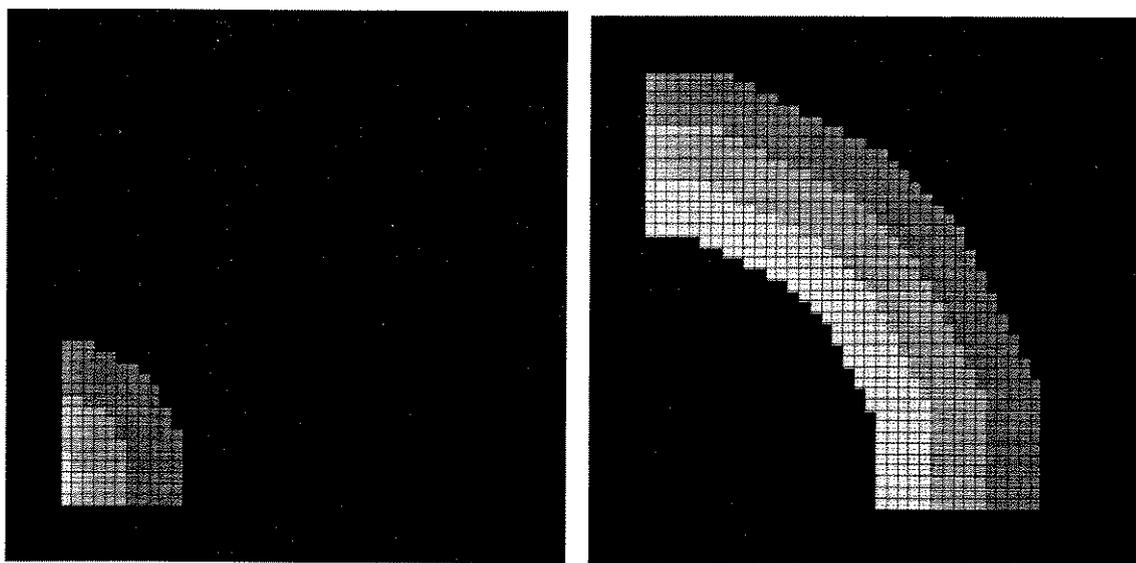
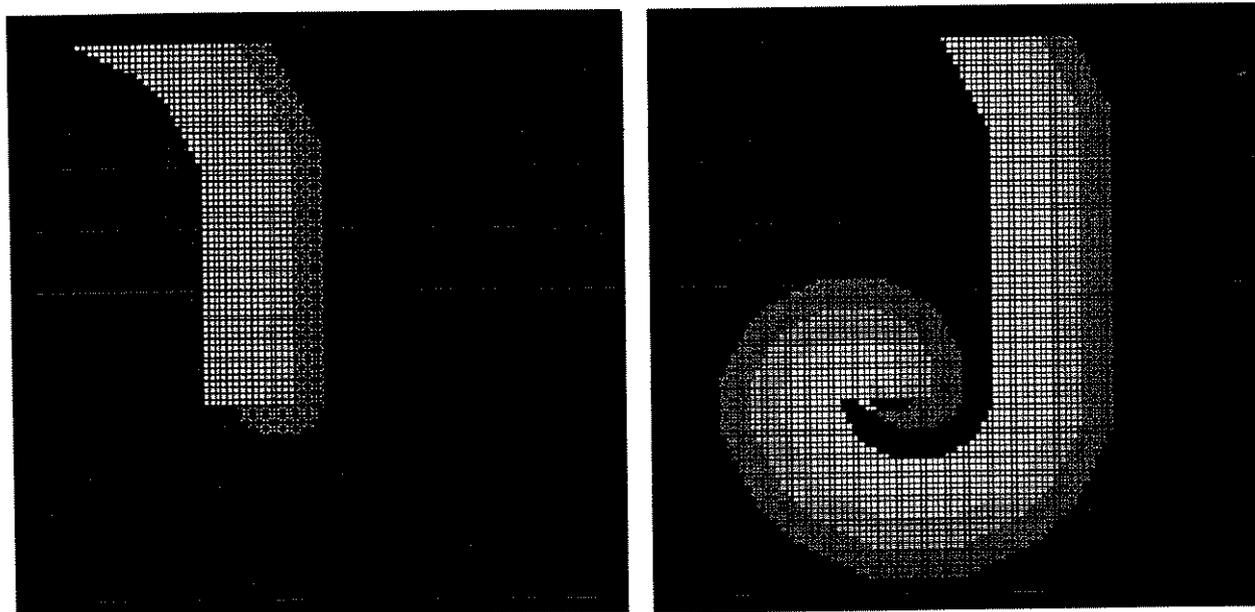


Figura 4.26 - Exemplo de onda solitária, na terceira e sétima gerações, respectivamente ($ra=1$, $rr=1$).

Há dois métodos experimentais para a geração de espirais na DA (Gorelova e Bureš, 1983, Dahlem e Müller, 1997), eles são: a aplicação de um campo elétrico sobre a retina, na região em que se localiza a frente de onda, e a aplicação de $MgSO_4$ na retina, também durante

a propagação, sobre uma parte da frente de onda. O método mais utilizado é o segundo. O sulfato de magnésio leva o tecido imediatamente à condição de quiescência. Para representar esta situação, à máquina acima foram acrescentadas conexões entre cada estado e o estado q , sendo que a condição de passagem de qualquer um deles para o q é a aplicação de $MgSO_4$. Apesar de o resultado da simulação desta máquina não ser facilmente previsível (porque não é imediato o fato de que uma parte da retina tornando-se excitável dê início a espirais), durante a simulação fica claro como ocorre a formação da espiral. A figura a seguir mostra duas gerações, na primeira vê-se uma onda solitária em que a parte inferior foi cortada da forma descrita acima. Na segunda a espiral se propaga pelo tecido que já voltou ao estado de quiescência (normalmente, sem ter sido feito o corte). Foram feitas simulações até a 50ª geração, e a espiral permanece visível. O fator crítico para a geração de espirais é o número de estados refratários absolutos. Se este número for grande⁴, a frente de onda não consegue manter a excitação na forma da figura 4.27 (b), pois esta parte do tecido ainda estará refratária. Neste caso observa-se o início de uma espiral, cuja frente (a ponta da onda) não consegue girar sobre si mesma, e então se transforma numa onda solitária novamente. Este comportamento também é observado durante os experimentos com a retina.



(a) geração em que é feito o corte;

(b) após 5 gerações.

Figura 4.27 - Exemplo de ocorrência de espirais. matriz de ordem 50, com $r_a = 1$ e $r_r = 2$.

⁴ Neste caso, o valor numérico depende da conectividade de cada célula. Sendo assim, quanto maior a ordem da matriz W (ou, em outras palavras, quanto maior o alcance de uma célula excitada), maior pode ser o número de estados refratários absolutos.

Outro teste é mostrado na figura 4.28, em que se coloca uma barreira quadrada (de tamanho 10x10) e se observa a alteração produzida na propagação da onda, que nesse caso condiz com o comportamento observado experimentalmente. A barreira simula uma lesão no tecido, o que impede a propagação naquela região.

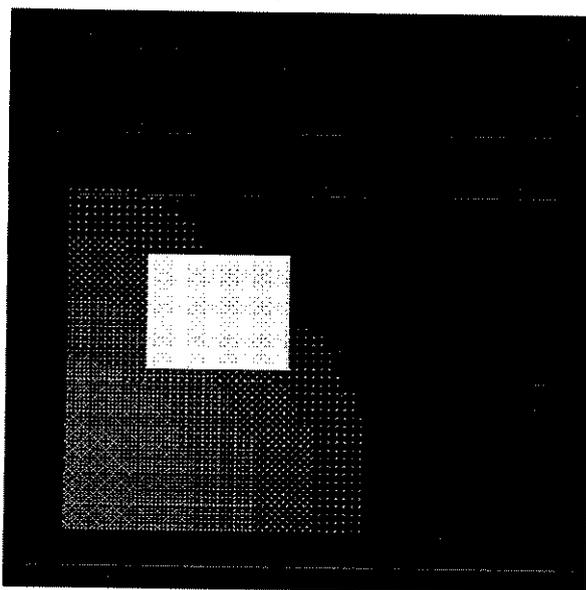
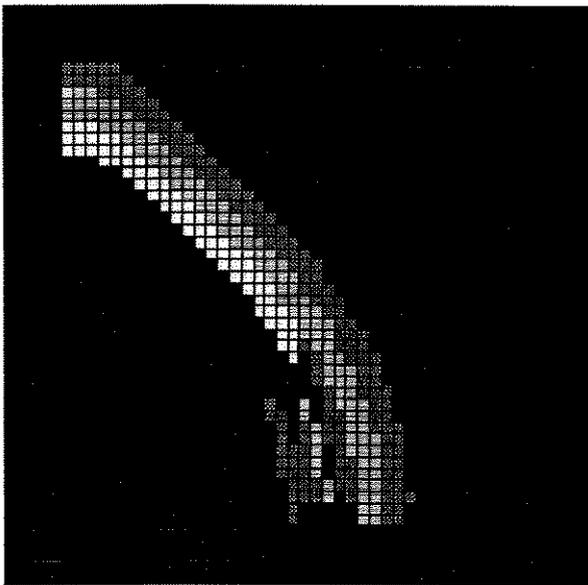


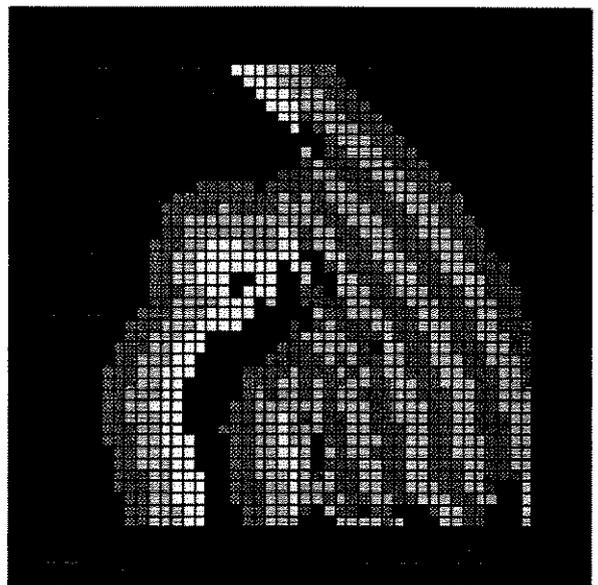
Figura 4.28- Simulação de lesão no tecido (barreira de ordem 10), períodos refratários $r_a=15$ e $r_r=10$ (matriz 50x50).

O programa do apêndice 3 se refere à simulação de um meio não-homogêneo, em que a fronteira de não-homogeneidade se localiza no meio da matriz, e os períodos refratários absolutos e relativos são diferentes para as duas regiões. Ainda no apêndice 3 são mostrados exemplos de simulações com colisões entre duas ondas (figura A3.1) e três gerações de espirais (figuras A3.2 a A3.4). Quanto ao meio não-homogêneo, nas gerações mostradas na figura 4.29, observa-se a formação espontânea de ondas com foco na fronteira. A ocorrência de ondas “espontâneas” a partir de uma região (foco) próxima à borda é comum em retinas perfundidas com soluções que contêm baixa concentração de magnésio. Nesta simulação, nota-se ainda a propagação não-homogênea. Este tipo de comportamento não havia sido previsto e não ocorreu em todas as ondas geradas. Mais uma vez, isto é também observado na retina, onde a existência de não-homogeneidades no meio é bastante freqüente. Entretanto, nunca se observa a ocorrência de uma onda imediatamente após a outra. Na reação de Belousov-Zhabotinsky foram feitos experimentos com alteração de excitabilidade e foi possível observar separação de ondas (Guriya et al., 1993). Esse texto relata a geração de uma onda na direção oposta à onda inicial, e então a geração de uma terceira onda na mesma direção da primeira, mas originada a partir da frente de onda da segunda. Na figura a seguir observamos

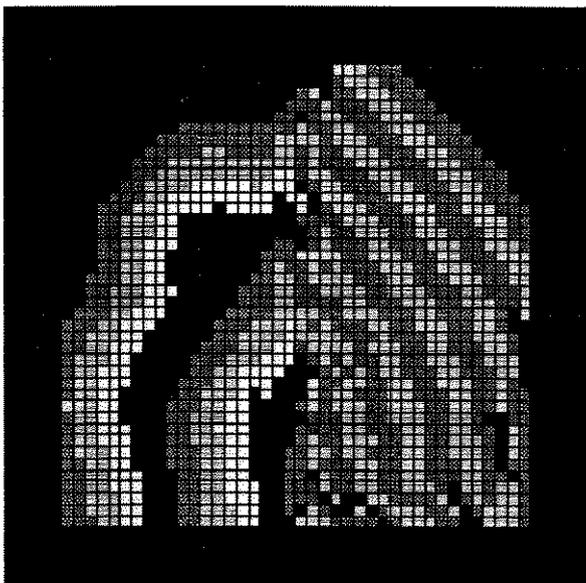
este comportamento nas ondas de DA simuladas, tal como observado experimentalmente no sistema BZ.



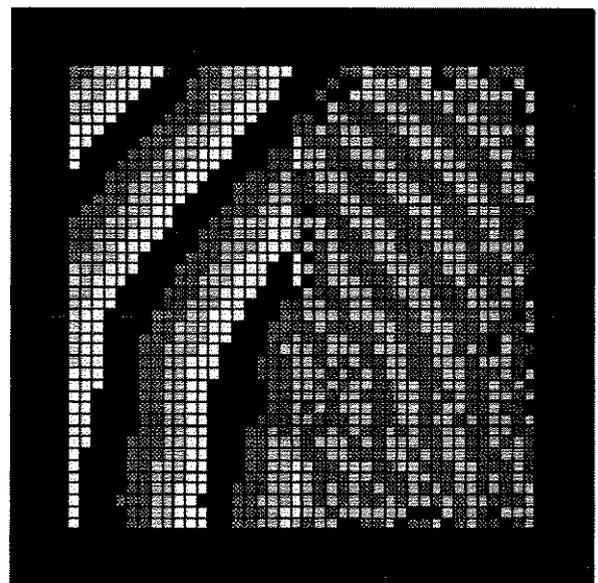
(a) décima-segunda geração



(b) décima-oitava geração



(c) décima-nona geração



(d) trigésima-quinta geração

Figura 4.29 - Simulação de meio não-homogêneo. Matriz de ordem 50. Períodos refratários do lado esquerdo (1) e direito (2) como segue: $ra_1=2$, $rr_1=1$; $ra_2=1$, $rr_2=1$.

4.3. Meios excitáveis e equações de reação-difusão

Apresentamos a seguir os pontos relevantes no desenvolvimento do modelo baseado nas equações de reação-difusão, como a configuração escolhida para a representação das células na IPL e a forma de implementação das funções. Também são apresentados os testes de validação e algumas das simulações feitas. Além da representação bidimensional da IPL, com este modelo temos a possibilidade de avaliar as alterações de potássio nos meios intra e extra-celular ao longo do tempo. A onda de potássio no meio extra-celular é particularmente interessante pela sua relação com a onda lenta de alteração de potencial vista durante a passagem da DA (Fernandes de Lima et al., 1993). Além disso, algumas das manipulações experimentais apresentadas anteriormente podem ser testadas avaliando-se o comportamento da onda de potássio. Por isso, alguns dos resultados obtidos com este modelo são discutidos a partir dos perfis relativos à concentração de potássio no meio extra-celular.

4.3.1. Implementação do modelo

O apêndice 4 apresenta o programa desenvolvido em Turbo C. A figura a seguir mostra a forma de configuração espacial escolhida para as células gliais que, na IPL, ocupam a maior parte do meio. Em termos volumétricos, a glia ocupa 60%, o meio extra-celular ocupa 20% e os terminais sinápticos outros 20%. Estima-se que o diâmetro total do seu corpo celular nesta camada seja da ordem de $50\mu\text{m}$, e que no total encontrem-se de dez a quinze processos por célula. Além disso, a intersecção entre duas células é muito significativa, a ponto de muitos autores terem afirmado a existência de *gap-junctions* entre elas (Schoffeniels et al., 1977, Gardner-Medwin, 1981). Entretanto, sabe-se agora que não há qualquer tipo de *gap-junctions* entre as células da glia na retina de galinha. Utilizando estes parâmetros estruturais, e adotando 13 processos para cada célula, o meio considerado foi dividido da forma apresentada, onde cada cor representa uma mesma célula, com exceção da preta, que representa o meio extra-celular. Cada glia se conecta, no total, com outras oito, sendo quatro diretamente, com intersecção de cinco processos (cada), e quatro com intersecção de um processo apenas. Este tipo de configuração do meio pretende simular o mecanismo (já discutido) de *buffer* espacial. No total, estas células cobrem 55% do número total de elementos do meio, sendo que uma matriz de ordem 30 comporta 25 células inteiras e modela um espaço de aproximadamente $150 \times 150 \mu\text{m}^2$.

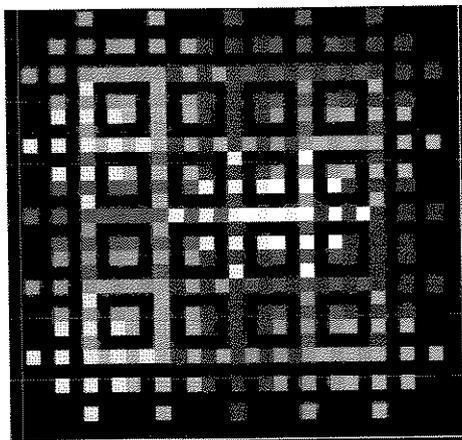


Figura 4.30 - Distribuição dos processos das células gliais no meio.

Além dos processos das células de Müller, consideram-se também os terminais sinápticos, que ocupam aproximadamente 20% do meio. Na figura 4.31 os neurônios são representados na cor branca.

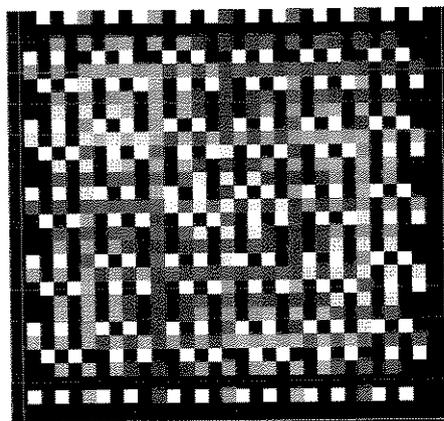


Figura 4.31 - Configuração espacial dos terminais sinápticos (em branco), meio extra-celular (em preto) e células gliais (cada cor representa uma célula), na camada plexiforme interna.

As fronteiras são absorventes, no sentido em que não produzem matéria, mas absorvem o excesso de potássio que fica acumulado no meio extra-celular. O potencial de equilíbrio do potássio é calculado para cada processo glial, enquanto o potencial de membrana de uma célula vale para todos os seus processos, já que é determinado pela área total da membrana celular. As funções discutidas no capítulo anterior foram implementadas na forma anteriormente apresentada, com a exceção de constantes multiplicativas usadas nas fórmulas para canais e bombas de potássio tanto nos terminais sinápticos quanto na glia. Estas constantes permitem simulações alterando-se o funcionamento (ou a força) relativa entre estes

elementos do sistema. Além das funções descritas, para a difusão no meio extra-celular foi utilizada a fórmula usual para o cálculo do Laplaciano discreto.

4.3.2. Teste de validação e simulações

Devido à facilidade de controle, neste tipo de modelo, de cada componente do sistema, os testes de validação propostos incluem a inibição de bombas e canais de membrana. Sendo assim, o primeiro teste feito foi o estímulo da matriz principal quando a glia é completamente inibida, ou seja, somente considerando o espaço extra-celular e os terminais sinápticos. Como previsto, o potássio se difunde pelo meio extra-celular e é absorvido pelos neurônios que se localizam em volta do estímulo. Não há propagação de onda, como apresentamos na figura 4.32. As cores representam diferentes níveis de concentração de potássio. No meio extra-celular, o cinza indica 4mM (em repouso), e nos terminais sinápticos o branco indica 140mM. Na parte **a** é feito o estímulo, de 30mM de potássio, e na **b**, após 20 interações, apesar dos níveis de concentração intra-celular de potássio alterados em algumas células, observa-se que não houve propagação da onda. Contudo, se a difusividade do potássio é aumentada (multiplicada por quatro, por exemplo), visualiza-se a propagação de uma onda extra-celular de potássio, como mostra a figura 4.33.

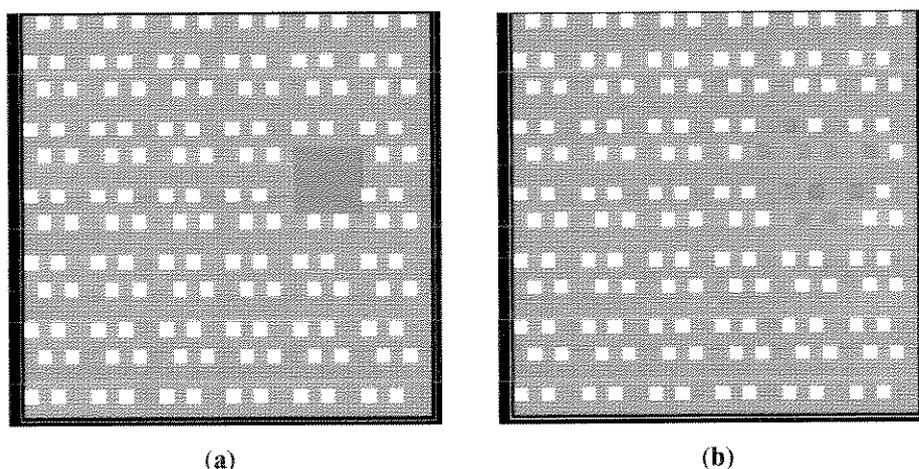


Figura 4.32 - Sem a glia, não há propagação de onda. (a) estímulo de 30mM na 1ª interação, (b) 20ª interação.

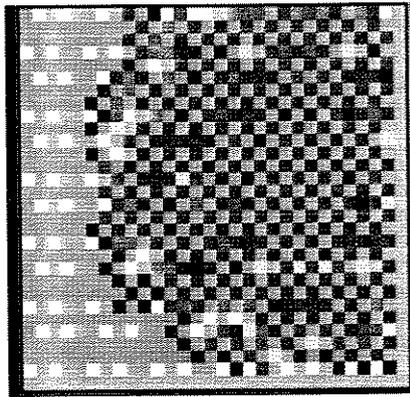


Figura 4.33 - Sem a glia, mas aumentando a difusividade do potássio, observa-se a propagação pelo meio extra-celular (estímulo como na figura 4.33, 20^a interação).

Incluindo as células de Müller, foram feitos testes com o sistema em regime, como mostra a figura 4.34, verificando-se os níveis de potássio no repouso, nos vários compartimentos considerados, e as tensões de membrana de equilíbrio na glia e terminais sinápticos. Neste caso, as avaliações foram numéricas e os valores foram ajustados de acordo com dados da literatura (Tuckwell e Miura, 1981 e doCarmo e Martins-Ferreira, 1984).

Foram então retiradas as bombas e canais dos terminais sinápticos. Com a aplicação de um estímulo de 70mM de potássio (no mínimo), o sistema apresenta a propagação da onda de potássio (através da glia e meio extra-celular), como mostra a simulação na figura 4.35. Observe que os terminais sinápticos mantêm a mesma concentração de potássio (140mM), e não interferem na propagação da onda, que é feita totalmente através da glia (representada pelos quadrados pequenos, em vermelho).

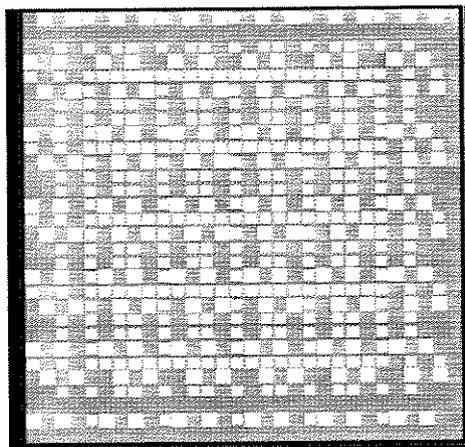


Figura 4.34 - Terminais sinápticos (quadrados brancos grandes) e células gliais (quadrados brancos pequenos) com concentração de potássio de 140mM, e meio extra-celular (em cinza) com 4mM.

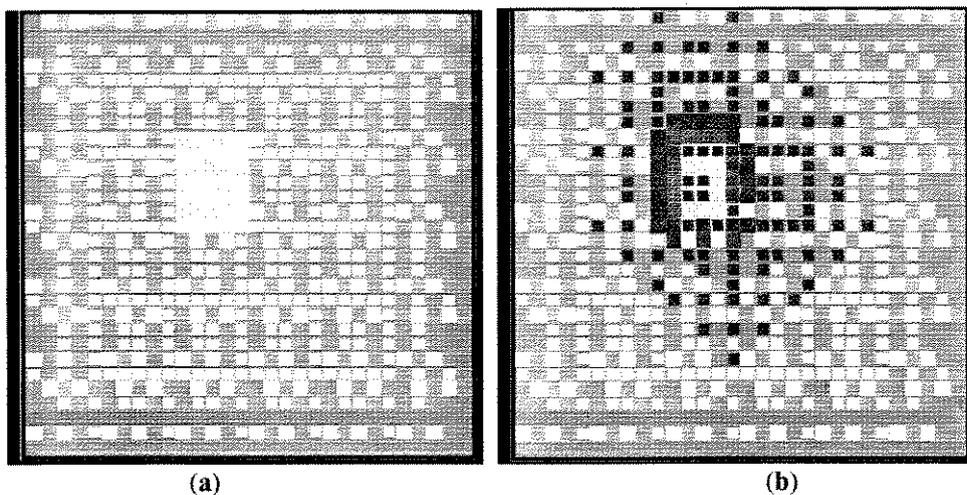


Figura 4.35 - Propagação da onda pela glia, representada pelos quadrados pequenos. (a) estímulo de 70mM de potássio na 1ª interação. (b) início da propagação, através da glia - 3ª interação.

As ondas de potássio e alterações nos potenciais de membrana celulares foram monitorados numericamente, e comparados com os resultados esperados. Passamos, a partir daqui, a discutir os principais resultados obtidos com relação às ondas de potássio no meio extracelular, dada a sua relevância para o fenômeno da DA e a possibilidade de comparação com resultados experimentais. A figura 4.36 apresenta as ondas de potássio para o mesmo tipo de simulação mostrada acima, ou seja, sem os terminais sinápticos. Apesar da propagação da onda, na região mais longe do estímulo (2) a concentração de K^+ chega a 7mM apenas.

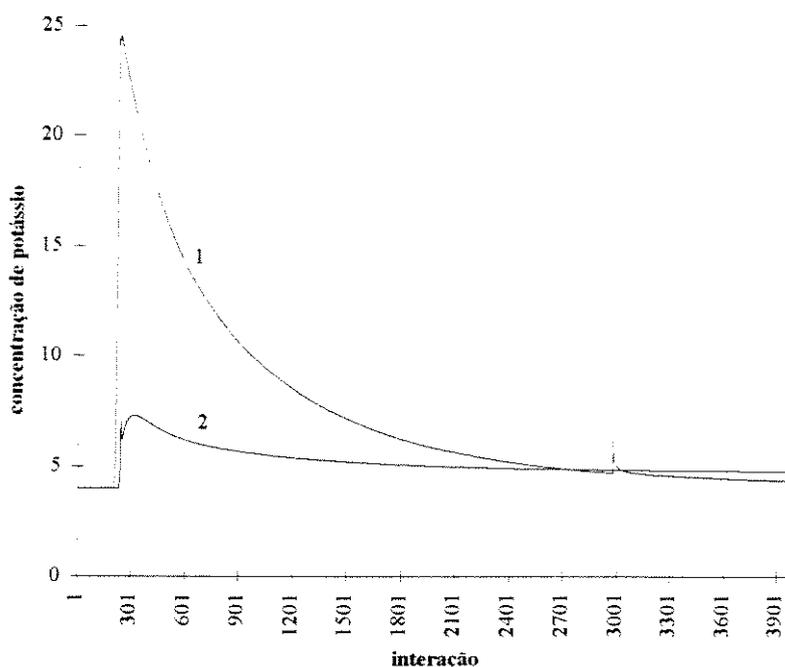


Figura 4.36 - Simulação sem terminais sinápticas. Estímulo de 70mM de potássio, na 200ª interação. Região 1: próxima ao estímulo. Região 2: ponto da matriz mais distante do estímulo.

Com todos os elementos do sistema, com a aplicação de um pulso de K^+ de 40mM, dependendo da razão entre a força da glia e terminais sinápticos e da difusividade do potássio, obtêm-se perfis diferentes para a onda no meio extra-celular, como mostram as figuras 4.37, 4.38 e 4.39. Na primeira a razão é de 1:1, enquanto na segunda e na terceira a força de cada célula glial é 10 e 2,5 vezes maior do que um neurônio, respectivamente.

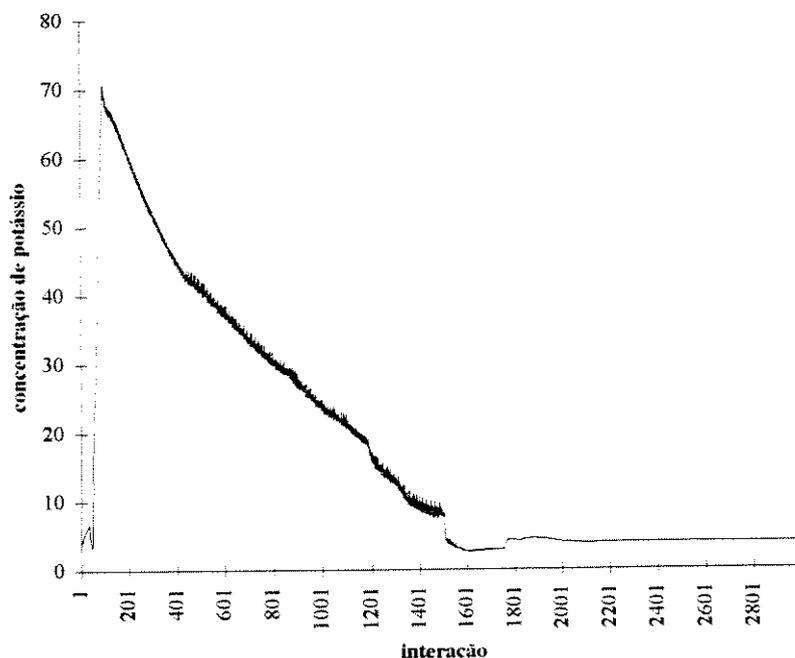


Figura 4.37 - Onda de potássio no meio extra-celular, com estímulo de 40mM na primeira interação.

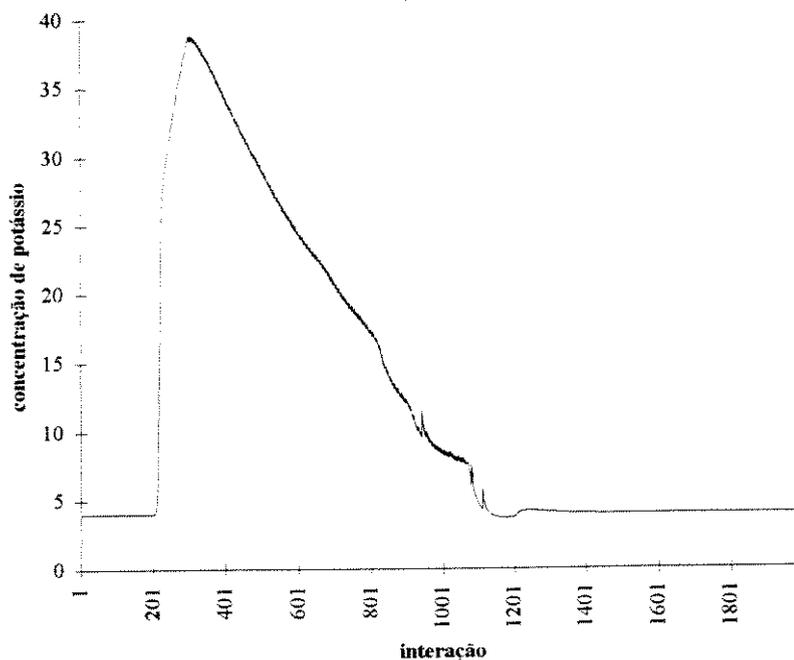


Figura 4.38 - Onda de potássio no meio extra-celular, com estímulo de 40mM na 200ª interação.

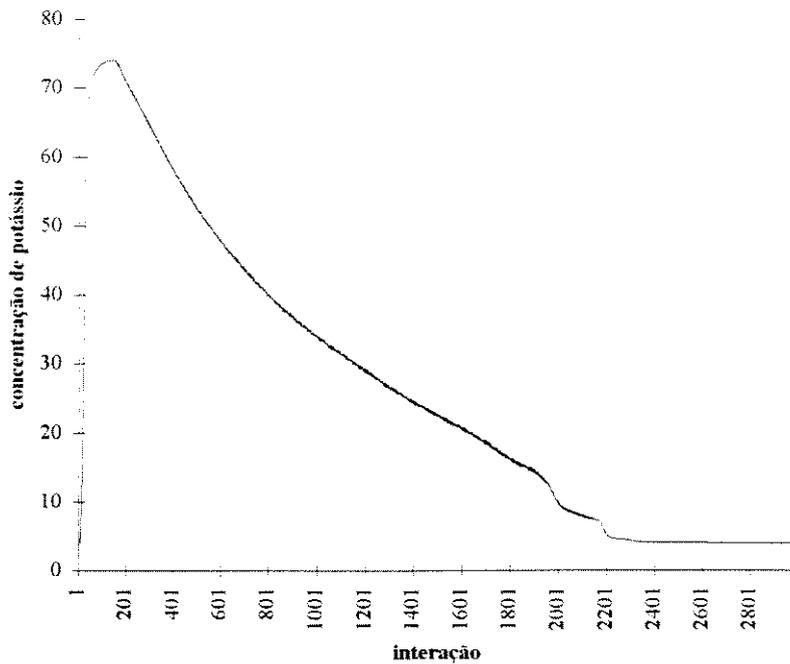


Figura 4.39 - Onda de potássio no meio extra-celular, com estímulo de 40mM na primeira interação.

A figura 4.40 mostra outro exemplo de ondas controle. Com o mesmo conjunto de parâmetros, mas “desativando” os canais de potássio da glia, são obtidas as ondas da figura 4.41. Nota-se aqui um aumento na amplitude das duas ondas, mas principalmente na que se refere à região mais distante do estímulo. Observa-se também a repolarização mais lenta do que nas ondas controle. Estas duas alterações são observadas experimentalmente, como relatado em (Fernandes de Lima et al., 1997).

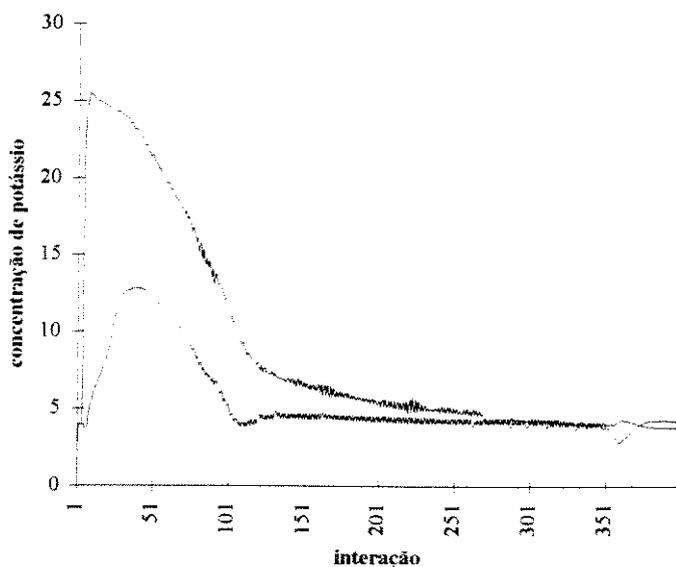


Figura 4.40 - Ondas de potássio no meio extra-celular, após o estímulo de 40mM, em duas regiões. uma próxima ao estímulo (pico da onda por volta de 25mM), e outra distante (pico de 13mM).

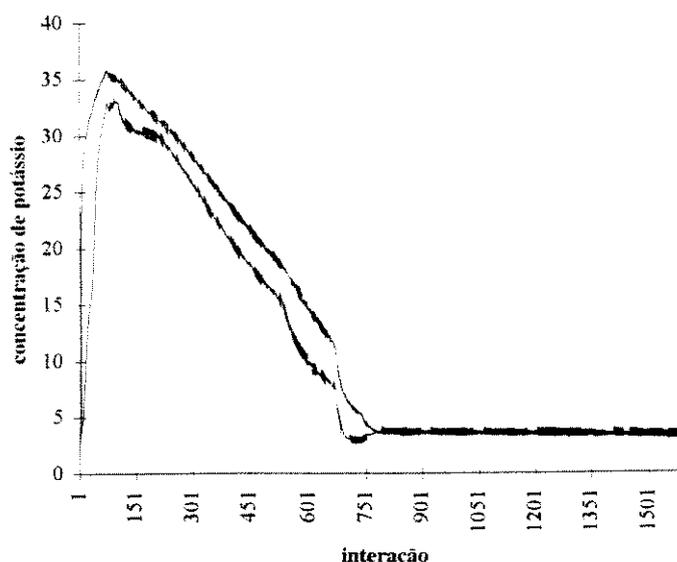


Figura 4.41 - Ondas de potássio no meio extra-celular, com o bloqueio dos canais de potássio da glia. As regiões mostradas são as mesmas que na figura anterior.

As duas figuras anteriores sugerem que, no momento do estímulo, todas as regiões da matriz são excitadas ao mesmo tempo. Entretanto isto não ocorre, como mostra a figura 4.42. Na vigésima interação após o estímulo as três regiões já apresentam alteração no nível de K^+ . Este intervalo relativamente curto para a fase de excitação se deve ao número de células gliais no meio. Qualquer região da matriz é separada de outra por no máximo cinco células gliais, o que significa que a matriz toda “sente” o estímulo em poucas interações. A volta aos valores de repouso acontece lentamente, pois independe do tamanho da matriz.

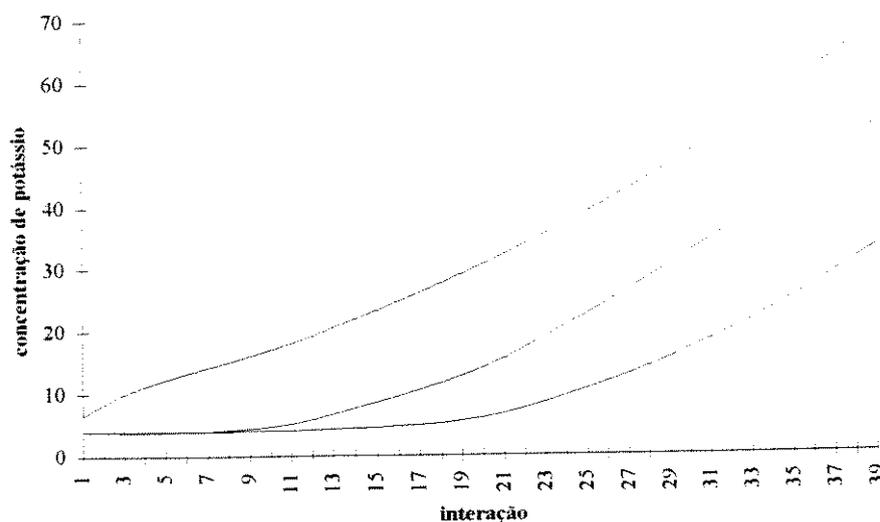


Figura 4.42 - Processo de excitação - alteração da concentração de potássio no extra-celular em três regiões diferentes, após o estímulo.

5. Discussão

Neste trabalho, pela primeira vez a relação temporal entre os sinais eletro-fisiológico e óptico é investigada. Demonstramos a concomitância entre a derivada do potencial extracelular e a mudança das propriedades ópticas do tecido em torno do eletrodo. Por outro lado, fica claro que a relação entre as duas variáveis não é linear, ou do tipo causa-consequência direta, uma vez que durante a propagação da onda a diferença de potencial pode permanecer nula em relação ao líquido de perfusão, e o sinal óptico ficar pouco afetado (experimentos com bário), ou o contrário, o sinal óptico estar muito deprimido a ponto de não ser possível determiná-lo mesmo com processamento de imagens, e no entanto a onda de potencial estar presente (experimentos com glicerol). Foi avaliada também a sensibilidade espacial do microeletrodo utilizado no registro do sinal elétrico, a partir da observação da relação temporal entre este sinal e o perfil óptico.

As relações espaço-temporais estabelecidas entre os concomitantes eletro-fisiológico e óptico da depressão alastrante a partir dos experimentos realizados são relevantes no sentido de determinar a dependência entre processos a nível molecular que dão início às alterações eletro-químicas presentes na propagação da onda e processos essencialmente físicos, que têm como principal consequência o sinal intrínseco óptico. Estes dois conjuntos de processos ainda não foram completamente desvendados, e algumas das questões mais interessantes a respeito da depressão alastrante enquanto fenômeno eletro-químico surgem devido à possibilidade de estabelecer hipóteses a partir dos escassos dados quantitativos disponíveis sobre este sistema.

Quanto às drogas testadas, a única que provocou um aumento de excitabilidade do sistema foi o sódio-barbital, alterando tanto a amplitude da onda lenta de potencial quanto a velocidade de propagação. Todas as outras deprimiram estas duas variáveis, de diversas formas, algumas vezes alterando inclusive as formas dos perfis elétrico e óptico.

Segundo a literatura (Goodman e Gilman, 1978, cap. 9), os barbitúricos deprimem reversivelmente as atividades de todos os tecidos excitáveis. Entretanto, há também relatos de aumento de excitabilidade quando administrados em doses baixas (Glaser et al., 1980), e até hoje não se sabe exatamente qual a sua ação a nível molecular. Os barbitúricos são comumente utilizados como anestésicos e anti-epilépticos, e assim justifica-se o seu uso para a avaliação da

sua influência sobre a retina durante a ocorrência da DA. Verificou-se o mesmo tipo de comportamento que em (Wiedemann et al., 1996), ou seja, aumento da velocidade e da amplitude das ondas. Nos concomitantes estudados, a aplicação de sódio-barbital indica o aumento de excitabilidade, intensificando a resposta do tecido a estímulos. Como não há alteração na forma dos perfis elétricos e ópticos, ou na amplitude do IOS nas ondas sob o efeito deste barbitúrico, pode-se supor que o movimento iônico massivo entre o meio extra e intra-celular acontece de forma semelhante às ondas controle.

A depressão da amplitude da alteração lenta do potencial extra-celular vista durante a DA e a diminuição da velocidade durante a aplicação de bário foram reportadas anteriormente em (Fernandes de Lima et al., 1993), além de um aumento da amplitude do sinal de potássio (Fernandes de Lima et al., 1994 e Fernandes de Lima e Hanke, 1997). Sendo assim, o movimento massivo de íons ainda ocorre, seja na troca entre os terminais e o extra-celular, seja via bombas de potássio da glia. Os experimentos apresentados confirmam que há, ainda sob o efeito de bário, trocas iônicas significativas, já que há a preservação do IOS. Dentre as drogas testadas, o cloreto de bário é a única que pode deprimir completamente o sinal elétrico (em 41% das ondas a depressão foi completa). Este comportamento indica uma forte associação entre este concomitante e o funcionamento dos canais de potássio da glia, dado que a aplicação de cloreto de bário (com concentração de até 1mM) bloqueia a maioria dos canais de potássio das células gliais (Brand e Hanke, 1996), mas não dos terminais sinápticos.

O glicerol é utilizado principalmente para avaliar a sua influência sobre o concomitante óptico da DA, já que, devido à sua alta viscosidade, ele dificulta o movimento de água entre os meios intra e extra-celular. Como não há a alteração do volume relativo entre o extra-celular e o intra-celular na passagem da onda, o sinal óptico fica completamente deprimido. Entretanto, o concomitante elétrico está presente, mostrando a existência da reorganização iônica durante a ocorrência da DA.

Em (Hanke e Fernandes de Lima, 1994) a influência de propanol sobre a onda de potássio é analisada qualitativamente. Nesse trabalho com ondas circulantes houve depressão do pico extra-celular do potássio para aproximadamente um terço do valor controle. O seu efeito reconhecido é o bloqueio da condutância de *gap-junctions*, ou do acoplamento elétrico entre células. O IOS foi bastante alterado durante a aplicação de propanol, bem como a amplitude do sinal elétrico. Uma interpretação possível é que esta droga aja em vários

processos celulares ao mesmo tempo, nos terminais sinápticos e na glia. No entanto, não encontramos explicação para a manutenção da velocidade de propagação, que, no trabalho citado acima, foi bastante deprimida.

Propranolol é um bloqueador beta-adrenérgico clássico (Goodman e Gilman, 1978, cap.26), ou seja, a sua reação com receptores de membrana inibe a produção de AMP-cíclico, que por sua vez é responsável pela fosforilação de proteínas controladoras da ativação ou desativação de canais iônicos na membrana. Na DA, a principal influência do propranolol é aumentar a velocidade de recuperação do tecido em termos dos níveis de brilhância do sinal óptico. Neste grupo de experimentos foi possível associar o fim do concomitante eletrofisiológico com a volta do IOS ao nível de brilhância da retina (quiescente). Uma interpretação possível para este resultado seria uma hipotética aceleração dos mecanismos de recuperação dos gradientes iônicos feita pelas bombas de transporte ativo. Experimentos específicos deverão ser realizados verificando tais efeitos nas várias bombas presentes nas membranas da glia e dos terminais sinápticos.

A influência da concentração do sódio na retina já foi analisada anteriormente, por Martins-Ferreira, nos textos (Martins-Ferreira, 1983 e Martins-Ferreira e doCarmo, 1987). Aumentando a concentração de cloreto de sódio na solução de perfusão de 100mM para 140mM, a retina, enquanto ainda no estado quiescente, passa a refletir a luz, devido à mudança na osmolaridade do meio. Contrariamente ao que ocorre durante o evento da DA em que as células incham, sob o efeito de cloreto de sódio elas perdem água, e o volume do meio extracelular aumenta, alterando a refratividade do tecido. A onda é então invertida, ou seja, durante a propagação vê-se o sinal óptico mais escuro do que a retina. Nos experimentos mostrados foi verificada a existência de dois picos no IOS, sendo que o primeiro deles é concomitante ao pico da derivada do sinal elétrico de forma semelhante às ondas controle.

A avaliação dos efeitos dos produtos químicos sobre a amplitude, velocidade e derivada das ondas corrobora a interpretação dada ao fenômeno da depressão alastrante enquanto interação neurônio-glia. Contudo, para uma comparação quantitativa entre os concomitantes elétrico e óptico é necessário um sistema de aquisição e análise de imagens mais sensível, além da avaliação da amplitude óptica do sinal em diversas faixas de frequências. Neste caso será possível, por exemplo, correlacionar a repolarização (referente ao sinal elétrico) com a volta

do sinal intrínseco óptico aos níveis de brilhância de fundo na retina, o que só pôde ser feito, neste trabalho, em alguns dos experimentos com propranolol.

A ocorrência da DA deve ser admitida como independente de certos fatores, a saber, aqueles que sejam características próprias de determinadas espécies ou sistemas, dada a sua possibilidade de elicitação em qualquer parte da matéria cinzenta central. A existência de *gap-junctions* entre diversos tipos de células gliais (na grande maioria das espécies estudadas) motivou a proposta do mecanismo de *buffer* espacial para a propagação da DA. Contudo, não há *gap-junctions* na retina de galinha (Prof.Dr. W.Hanke, comunicação pessoal), o que torna a ocorrência deste fenômeno independente da existência de sincícios elétricos acoplados via *gap-junctions*. Todavia, a interseção espacial entre os processos das células gliais na IPL, sugere que há um intenso acoplamento elétrico entre elas. Além disso, *gap-junctions* estão presentes na IPL entre neurônios (Prof.Dr. W.Hanke, comunicação pessoal).

A comparação com outros sistemas que apresentam os mesmos tipos de comportamento que a DA é produtiva na medida em que provê hipóteses ainda não consideradas. Por exemplo, durante a isquemia a diferença de potencial (ddp) entre o tecido afetado e o tecido vivo é da ordem de 20mV (o tecido isquêmico é negativo com relação ao não afetado). Esta ddp é atribuída à difusão. Na DA, a fase de excitação é associada principalmente ao processo de *feedback* positivo de liberação de potássio pelos canais sinápticos, e posteriormente à atuação da glia. Pouca atenção é dada à difusão, à qual é entretanto atribuída parte da recuperação do tecido.

Quanto aos dois modelos implementados, o autômato celular sugere um enfoque fenomenológico, enquanto no modelo baseado em equações de reação-difusão a interpretação proposta é a de mecanismos atuando a nível celular. Ambos apresentaram os comportamentos observados experimentalmente na DA, mas cada um propicia um tipo de análise do fenômeno estudado. Para a avaliação dos efeitos de drogas, cuja alteração a nível local (celular) é conhecida, é mais adequado um modelo em que se tem uma descrição destas inter-relações locais, como é o caso quando a retina é vista como meio excitável. Por outro lado, para analisar a formação de padrões geométricos basta interpretar o sistema como um autômato celular, sem a necessidade de definir claramente a função de cada componente do meio.

Com o enfoque dos autômatos celulares é possível estender o conjunto de regras (ou de estados da máquina) de forma a modelar outros comportamentos macroscópicos referentes ao

IOS das ondas de DA. Mais ainda, este modelo apresenta a diversidade de formas de onda característica das descrições dos escotomas visuais da enxaqueca (Sacks, 1992). Por outro lado, algumas das simulações se aproximam mais de outros modelos experimentais, como por exemplo no caso das espirais. Seguindo por várias gerações o local do núcleo da espiral formada na retina, observa-se a formação de padrões em forma de Z (Dahlem e Müller, 1997). Com o modelo implementado, as espirais formadas apresentaram movimento circular do núcleo. Este tipo de comportamento é observado no sistema BZ (Fast e Efimov, 1991). Outro comportamento apresentado por este modelo, é a geração de ondas espontâneas como resultado de alterações de excitabilidade no meio (retirada de sulfato de magnésio da perfusão, por exemplo). Novamente, este comportamento pode ser associado a uma manipulação experimental no sistema BZ (Guriya et al., 93).

A partir da interpretação da retina como meio excitável, mostramos a sua capacidade de geração de ondas. Os comportamentos apresentados estão de acordo com as ondas medidas experimentalmente para o potássio (Martins-Ferreira, 1983 e Fernandes de Lima et al., 1994). Uma análise quantitativa detalhada, isto é, com resultados que sejam diretamente associados a experimentos, pode ser feita com o uso do modelo baseado em equações de reação-difusão, mas são necessários, neste caso, dados numéricos relativos a concentrações iônicas nos espaços intra e extra-celular além dos valores de potencial de membrana para a glia e terminais sinápticos especificamente para a retina e durante a passagem da onda de DA. Com as simulações apresentadas mostramos a viabilidade deste modelo e também a sua capacidade de exibição de comportamentos de conjunto que haviam sido inicialmente admitidos apenas para os autômatos celulares. Apesar da complexidade do sistema, cujo comportamento global depende de interações não-lineares entre seus elementos, propõem-se hipóteses simples que explicam a propagação das ondas. Dois mecanismos são essenciais para a ocorrência da depressão alastrante da forma como a interpretamos: o de *feedback* positivo (ou a auto-catálise) e o *buffer* espacial. Com a exibição de ondas mostramos a relevância de ambos os mecanismos para a propagação da onda. Mais ainda, provamos que não é necessário que haja difusão pelas células gliais (no sentido tradicional, como modelada pela lei de Fick) para que se observe a ocorrência da depressão alastrante, uma vez que mesmo retirando o efeito da glia a propagação é possível. Propagação de ondas circulantes com dinâmicas bem diferentes para os íons cálcio e potássio e forma de potencial foram demonstradas experimentalmente na retina (Fernandes de Lima e Hanke, 1997). Finalmente, demonstramos que o bloqueio dos canais de

potássio da glia, mantida a função da bomba, altera a dinâmica do potássio extra-celular da forma observada nos experimentos anteriores (Fernandes de Lima et al., 1993).

6. Conclusões

Os experimentos realizados mostram, pela primeira vez, a relação espaço-temporal entre os concomitantes eletro-fisiológico e óptico das ondas de depressão alastrante. Através dos efeitos das manipulações fármaco-químicas e da sua comparação com dados da literatura é possível corroborar algumas das hipóteses propostas para a ocorrência das ondas na retina, além da verificação da relação não-linear entre os dois concomitantes analisados. Os resultados obtidos sugerem a realização de outros experimentos, com o objetivo de esclarecer algumas questões como a da dependência entre a recuperação do tecido com relação à sua excitabilidade e a volta do nível de brilhância ao valores anteriores à propagação da onda.

Os dois modelos desenvolvidos reproduzem a forma de propagação de onda vista durante a ocorrência das ondas de depressão alastrante. A validação do modelo baseado em autômatos celulares é feita pela semelhança geométrica com as ondas na retina e pelo comportamento em situações como a colisão e geração de espirais e no caso de lesões no tecido. A principal previsão deste modelo é a geração de ondas em meios não-homogêneos a partir da fronteira entre eles. O modelo sintético, desenvolvido a partir da teoria de meios excitáveis, mostra ondas de potássio (alterações na concentração deste íon) no meio extracelular durante a propagação da onda, e mudanças nos mecanismos de membrana modelados têm como consequência alterações similares às aquelas verificadas experimentalmente. Conclui-se, assim, que as duas formas de interpretação propostas para a DA são adequadas para a sua descrição tanto a nível macroscópico quanto com relação às interações entre seus elementos.

6.1. Sugestões para trabalhos futuros

Há diversas questões interessantes a serem investigadas sobre a depressão alastrante, como por exemplo: quais são os fatores realmente essenciais para a ocorrência da depressão alastrante? O que determina a geração de ondas espontâneas no tecido? Como interpretar as espirais sob o ponto de vista do modelo biológico? Qual a participação relativa das populações de glia e neurônios nos fenômenos concomitantes à DA? Neste trabalho foram sugeridas algumas respostas para estas questões. Outras respostas (para estas e outras perguntas) podem ser investigadas a partir dos trabalhos sugeridos a seguir.

A composição da onda de potássio pode ser avaliada em função das participações relativas da glia e dos terminais sinápticos através de experimentos com outras drogas (além do cloreto de bário) e eletrodos sensíveis a íons. Ainda com eletrodos sensíveis a íons, mas utilizando também os eletrodos usuais para medidas de potencial extra-celular, é possível desenvolver experimentos em que se obtenha simultaneamente as ondas de potencial, potássio, sódio e cálcio. Neste caso seria possível investigar também relações de causa-efeito entre estes concomitantes.

Alguns parâmetros do modelo de equações de reação-difusão podem ser ajustados, com a finalidade de simular quantitativamente os comportamentos observados também para outros íons como sódio, cálcio e cloro. Pode-se ainda generalizar o modelo desenvolvido, admitindo qualquer meio e restringindo as funções para os processos responsáveis pelas fases de excitação e recuperação do tecido.

Os dois enfoques teóricos sugeridos podem ser estendidos para três dimensões, modelando várias camadas. A retina é, neste caso, o sistema mais adequado para o modelamento, devido à divisão laminar das camadas, em que se pode facilmente identificar os processos celulares presentes.

7. Bibliografia

Agladze, K., Keener, J.P., Müller, S.C., Panfilov, A., Rotating spiral waves created by geometry. **Science**, v. 264, n. 5166, p. 1746-1748, 1994.

Barkley, D., A model for fast computer simulation of waves in excitable media. **Physica D**, v. 49, p. 61-70, 1991.

Becker, D.P., Eine Modellreaktion für biologische Oszillationen. **Biologie in unserer Zeit**, p. 156-159, 1977.

Boccaro, N., Nasser, J., Roger, M., Particlelike structures and their interactions in spatiotemporal patterns generated by one-dimensional deterministic cellular-automaton rules. **Physical Rev. A**, v. 44, n. 2, p. 866-875, 1991.

Brand, S., Hanke, W., Properties of retinal glial cell potassium channels. **J. Brain Research**, v. 37, n. 1, p. 73-79, 1996.

Brand, S., Dahlem, M., Fernandes de Lima, V.M., Müller, S.C., Hanke, W., Dispersion Relation of spreading depression in chicken retina. A aparecer em: **Chaos and Bifurcation**, 1997.

Bureš, J., Burešová, O., Krivánek, J., Meaning and significance of Leão's spreading depression. **Acad. Bras. Ciências**, v. 56, n. 4, p. 385-400, 1984.

Bureš, J., History of experimental spreading depression, in: Lehmenkühler, A., Grotemeyer, F., Tegtmeier (eds.), **Migraine, Basic Mechanisms and Treatment**. Urban & Schwarzenberg, 1993, p. 279-292.

Castro, G.O., Martins-Ferreira, H., Deformations and thickness variations accompanying spreading depression in the retina. **J.Neurophys.**, p. 891-900, 1970.

Chebabo, S.R., do Carmo, R.J., Martins-Ferreira, H., Effects of local anaesthetics on retinal spreading depression. **Exp. Brain Research**, v. 96, p. 363-364, 1993.

Dahlem, M.A., **Untersuchungen der Dynamik von Spiralzentren in retinaler Spreading Depression**. Dritte Physikalische Institut. Univ. de Göttingen, Alemanha. Tese de mestrado, 1994.

Dahlem, M.A., Müller, S.C., Self-induced splitting process on spiral-shaped spreading depression waves. A aparecer em: **Experimental Brain Research**, 1997.

Dellnitz, M., Golubitsky, M., Hohmann, A., Stewart, I., Spirals in scalar reaction-diffusion equations. **International Journal of Bifurcation and Chaos**, v. 5 n. 6, p. 1487-1501, 1995.

do Carmo, R.J., Martins-Ferreira, H., Spreading depression of Leão probed with ion-selective microelectrodes in isolated chick retina. **Acad. Bras. Ciências**, v. 56, n. 4, p. 401-422, 1984.

do Carmo, R.J., **Spreading Depression**. Springer Verlag, 1992.

Dowling, J.E., **The Retina: An Approachable Part of the Brain**. The Belknap Press of Harvard Univ. Press, 1987.

Einstein, A., **Investigation on the theory of brownian movement**. New York: Dover, 1956.

Ermentrout, G.B., Edelstein-Keshet, L., Cellular automata approaches to biological modeling. **J. Theor. Biology**, v. 160, p. 97-133, 1993.

Fast, V.G., Efimov, I.R., Stability of vortex rotation in an excitable cellular medium. **Physica D**, v. 49, p. 75-81, 1991.

Fernandes de Lima, V.M., Scheller, D., Tegtmeier, F., Hanke, W., Schlue, W.R., Self-sustained spreading depressions in the chicken retina and short-term neuronal-glia interactions within the gray matter neuropil. **Brain Research**, v. 614, p. 45-51, 1993.

Fernandes de Lima, VM, Goldermann, M, Hanke, W, Calcium waves in gray matter are due to voltage-sensitive glial membrane channels. **Brain Research**, v. 663, p. 77-83, 1994.

Fernandes de Lima, VM, Hanke, W, Excitation waves in central grey matter: the retinal spreading depression. **Progress in Eye and Retina Research**, v. 16, n. 3, p. 1-32, 1997.

Fernandes de Lima, VM, Goldermann, M, Hanke, W, **The Retinal Spreading Depression: An Interdisciplinary Research Tool**. Cambridge Academic Press, 1997.

Field, R.J., Noyes, R.M., Oscillations in chemical systems II. thorough analysis of temporal oscillation in the bromate-cerium-malonic acid system. **J.Am.Chem.Soc.**, v. 94, p. 8649-8665, 1972.

Field, R.J., Noyes, R.M., Oscillations in chemical systems IV. limit cycle behavior in a model of a real chemical reaction. **J. Chem.Phys.**, v. 60, p. 1877-1884, 1974.

Field, R.J., Noyes, R.M., Oscillations in chemical systems V. quantitative explanation of band migration in the Belousov-Zhabotinskii reaction. **J.Am.Chem.Soc.**, v. 96, p. 2001-2008, 1974.

Gardner, M., The fantastic combinations of John Conway's new solitaire game life. **Scientific American**, p. 120-123, 1970.

Gardner, M., On cellular automata, self-reproduction, the garden of Eden and the game life. **Scientific American**, p. 112-117, 1971.

Gardner-Medwin, A.R., Possible roles of vertebrate neuroglia in potassium dynamics, spreading depression and migraine. **J. exp. Biology**, v. 95, p. 111-127, 1981.

Gardner-Medwin, A.R., Analysis of potassium dynamics in mammalian brain tissue. **J. exp. Biology**, v. 335, p. 393-426, 1983.

Gerhardt, M., Schuster, H., A cellular automaton describing the formation of spatially ordered structures in chemical systems. **Physica D**, v. 36, p. 209-221, 1989.

Glaser, G.H., Penry, J.K., Woodbury, D.M., **Antiepileptic Drugs, Mechanisms of Action**. Advances in Neurology, v. 27, Raven Press, 1980.

Goodman, L.S., Gilman, A., **As bases farmacológicas da terapêutica**. 5^a ed., Guanabara Koogan, 1978.

Gorelova, N.A., Bureš, J., Spiral wave of spreading depression in the isolated chicken retina. **J. Neurobiology**, v. 14, p. 353-363, 1983.

Gouras, P., Spreading depression of activity in amphibian retina. **Am. J. of Physiol.**, v. 195, p. 28-32, 1958.

Greenberg, J.M., Hastings, S.P., Spatial patterns for discrete models of diffusion in excitable media. **SIAM J.Appl. Math.**, v. 34, n. 3, p. 515-523, 1978.

Greenberg, J.M., Hassard, B.D., Hastings, S.P., Pattern formation and periodic structures in systems modeled by reaction-diffusion equations, American Mathematical Soc., v. 84, n. 6, p. 1296-1327, 1978.

Grossman, R.G., Glial-Neural interaction studied with intracellular injection of ions into cortical glia, in: Schoffeniels, E. et al. (ed.), **Dynamic Properties of Glial Cells**. Pergamon Press, 1977.

Guriya, G.T., Kiyatin, A.B., Müller, S.C., Autowave splitting in Belousov-Zhabotinsky reaction-diffusion system. **Biofizika**, v. 38, n. 3, p. 463-467, 1993.

Gutowitz, H.A., A hierarchical classification of cellular automata. **Physica D**, v. 45, p. 136-156, 1990.

Gutowitz, H.A., Transients, cycles and complexity in cellular automata. **Physical Review A**, v. 44, n. 12, p. R7881-R7884, 1991.

Haeseler, F.V., Peitgen, H.-O., Skordev, G., Global analysis of self-similarity features of cellular automata: selected examples. **Physica D**, v. 86, p. 64-80, 1995

Haken, H., **Synergetics**. Springer-Verlag, 1977.

Hanawa, K., Kuge, I., Matsumura, K., Studies on the slow depressive potential of the isolated frog retina. **The Japanese J. of Physiology**, v. 17, p. 321-324, 1967.

Hanawa, K., Kuge, I., Matsumura, K., Mechanism of the slow depressive potential production in the isolated frog retina. **The Japanese Journal of Physiology**, v. 18, p. 59-77, 1968.

Hanke, W., Fernandes de Lima, V.M., Schlue, W.-R., Patch-clamp experiments in the intact chicken retina during spreading depression. in: Lehmenkuhler, A. et alli (eds.), **Migraine: Basic Mechanisms and Treatment**. Urban & Schwarzenberg, 1993.

Hanke, W., Fernandes de Lima, V.M., Neuronal-glial interaction during retinal spreading depression. **Zeitschrift für Hirnforschung**, v. 35, n. 1, p. 148-150, 1994

Hoppensteadt, F.C., Peskin, C.S., **Mathematics in medicine and the life sciences**. Springer-Verlag, 1992.

- Jouaville, L.S., Ichas, F., Holmuhamedov, E.L., Camacho, P., Lechleiter, J.D., Synchronization of calcium waves by mitochondrial substrates in *Xenopus laevis* oocytes. **Nature**, v. 377, p. 438-441, 1995
- Kapral, R., Pattern formation in chemical systems, **Physica D**, 86, p. 149-157, 1995
- Krinsky, V.I., Efimov, I.R., Vortices with linear cores in mathematical models of excitable media. **Physica A**, v. 188, p. 55-60, 1992.
- Krinsky, V.I., Efimov, I.R., Jalife, J., Vortices with linear cores in excitable media. **Proc. R. Soc. London A**, v. 437, p. 645-655, 1992.
- Lashley, K.S., Mass Action in Cerebral Function. **Science**, p. 245-254, 1931.
- Lashley, K.S., Patterns of cerebral integration indicated by the scotomas of migraine. **Arch. Neurol. Psych.**, v. 46, p. 331-339, 1941.
- Leão, A.A.P., Spreading depression of activity in cerebral cortex. **J. Neurophysiology**, v. 4, p. 359-390, 1944a.
- Leão, A.A.P., Pial circulation and spreading depression activity in cerebral cortex. **J. Neurophysiology**, v. 7, p. 391-396, 1944b.
- Leão, A.A.P., Further observations on the spreading depression activity in the cerebral cortex. **J. Neurophysiology**, v. 10, p. 409-414, 1947.
- Marshall, W.H., Relation of dehydration of brain to spreading depression of Leão. **EEG Clin. Neurophysiol.**, v. 2, p. 177-185, 1950
- Martins-Ferreira, H. et alli, Circling spreading depression in isolated chick retina. **J. Neurophysiology**, v. 37, p. 773-784, 1974.
- Martins-Ferreira, H., Spreading depression in the chicken retina. in: Ookawa, T. (ed.), **The Brain and Behavior of the Fowl**. Tokyo: Japan Scientific Societies Press, 1983, p. 317-333.
- Martins-Ferreira, H., doCarmo, R.J., Retinal spreading depression and the extracellular milieu. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 65, p. 1092-1098, 1987.
- Meinhardt, H., Development of higher organisms: how to avoid error propagation and chaos. **Physica D**, v. 86, p. 96-103, 1995.

- Milner, P.M., Note on a possible correspondence between the scotomas of migraine and spreading depression of Leão. **EEG Clin. Neurophysiol.**, v. 10, p. 705, 1958.
- Moses, R.A. (ed.), **Physiology of the eye**. The C.V. Mosby Company, 1981.
- Müller, S.C., Spatial Patterns in (Bio)Chemical Reactions, in: Markus, M., Müller, S.C., Nicolis, G. (eds.), **From Chemical to Biological Organization**. Berlin: Springer-Verlag, 1988.
- Murray, J., **Mathematical Biology**. Springer Series in Biomathematics, vol. 19, Springer Verlag, 1989.
- Nagumo, J., Arimoto, S., Yoshizawa, S., An active pulse transmission line simulating nerve axon. **Proc. IRE**, v. 50, p. 2061-2070, 1962.
- Newman, E.A., Membrane physiology of retinal glial (Müller) cells. **J. Neurosciences**, v. 5, p. 2225-2239, 1985.
- Nicholson, C., Kraig, R.P., The behavior of extracellular ions during spreading depression. in: Zeuthen, T. (ed.), **The application of ion-selective microelectrodes**. Amsterdam: Elsevier, 1981. p. 217-238.
- Prigogine, I., Stengers, I., **Order out of Chaos**. London: Harper-Collins Pub., 1984.
- Purves, R.D., **Microelectrode methods for intracellular recording and iontophoresis**. Academic Press, 1981.
- Reggia, J.A., Montgomery, D., A computational model of visual hallucinations in migraine. **Comput. Biol. Med.**, v. 26, n. 2, p. 133-141, 1996.
- Richard, F.C., Meyer, T.P., Packard, N.H., Extracting cellular automaton rules directly from experimental data. **Physica D**, v. 45, p. 189-202, 1990
- Ross, J., Müller, S.C., Vidal, C., Chemical waves. **Science**, v. 240, p. 260-265, 1988.
- Ruch, Patton, **Physiology and Biophysics**. WB Saunders Company, 1965.
- Sacks, O., **Migraine**. 2nd ed., California Univ. Press, 1992.
- Schoffeniels, E., Franck, G., Hertz, L., Tower, D.B. (ed.), **Dynamic Properties of Glial Cells**. Pergamon Press, 1977.

Scott, S.K., Chemical reactions as nonlinear systems. **Nonlinear Science Today**, v. 2, n. 3, p. 2-13, 1987.

Sugaya, E., Takato, M., Noda, Y., Neuronal and glial activity during spreading depression in cerebral cortex of cat. **J. Neurophysiol.**, v. 38, p. 822-841, 1975.

Sugaya, E., Takato, M., Noda, Y., Sekiya, Y., Glial cells and spreading depression. in: Schoffeniels, E. et alli (eds.), **Dynamic Properties of Glial Cells**. Pergamon Press, 1977.

Toffoli, T., Margolus, N., **Cellular Automata Machines**. The MIT Press, 1988.

Tomita, T., Spreading depression potential in the frog retina. **Acad. Bras. Ciências**, v. 56, n. 4, p. 505-518, 1984.

Tuckwell, H.C., Miura, R.M., A mathematical model for spreading cortical depression. **Biophysics Journal**, v. 23, p. 257-276, 1978.

Tuckwell, H.C., Predictions and properties of a model of potassium and calcium ion movements during spreading cortical depression. **Intern. Journal Neuroscience**, v. 10, p. 145-164, 1980.

Tuckwell, H.C., Miura, R.M., Simplified reaction-diffusion equations for potassium and calcium ion concentrations during spreading cortical depression. **Intern. Journal Neuroscience**, v. 12, p. 95-107. 1981.

Tuckwell, H.C., **Introduction to theoretical neurobiology, vol.2, Nonlinear and stochastic theories**. Cambridge Univ. Press, 1988.

Turing, A.M., The Chemical basis of morphogenesis. **Phil. Trans. Roy. Soc. - Series B**, v. 237, 1952

Victor, J.D., What can automaton theory tell us about the brain? **Physica D**, v. 45, p. 205-207, 1990

Vyskocil, F., Driz., N., Bureš, J., Potassium-selective microelectrodes used for measuring the extracellular brain potassium during spreading depression and anoxic depolarization in rats. **Brain Research**, v. 39, p. 255-259, 1972.

Wiedemann, M., Der Einfluß handelsüblicher Migränemedikamente auf die retinale "Spreading Depression", Universidade de Hohenheim, Stuttgart, Alemanha, Tese de mestrado, 1995.

Wiedemann, M., Fernandes de Lima, V.M., and Hanke, W., Effects of antimigraine drugs on retinal spreading depression. **Nan. Nyn. Schmiedberg Archives of Pharmacology**, v. 353, p. 552-556, 1996.

Winfrey, A.T., Persistent tangled vortex rings in generic excitable media. **Nature**, v. 371, n. 6494, p. 233-236, 1994.

Zaikin, A.N., Zhabotinski, A.M., Concentration wave propagation in two-dimensional liquid-phase self-oscillating system. **Nature**, v. 225, p. 535-537, 1970.

Lista de abreviaturas

A/D	(conversor) analógico-digital
ANOVA	análise de variância (do inglês, <i>analysis of variance</i>)
BZ	Belousov-Zhabotinsky (sistema químico)
CA	autômato celular (do inglês, <i>cellular automata</i>)
DA	depressão alastrante
GHK	(fórmula de) Goldman-Hodgkin-Katz
IOS	sinal intrínseco óptico (do inglês, <i>intrinsic optical signal</i>)
IPL	camada plexiforme interna (do inglês, <i>inner plexiform layer</i>)
Tris	tri-hidróxi-metilamino-metano

Apêndice 1. Programa desenvolvido para a aquisição de imagens digitalizadas. Sistema SEMPER6P (SYNOPTICS).

```
prp()
    !file: prp.spl
    ! system: SEMPER6PLUS - SYNOPTICS
    ! goal: do the analysis as automatically as possible
pag pro;    ! page prompt
echo nomonitor
echo nocommand
par 1 siz 770,470 pos 0,0
    ! parameters of the screen (partition 1) to be acquired
    ! we have 770 pixels in x and 470 in y
fir =1
    !first number of the loop
tra =-1
    ! doesn't stop if common errors occur (trap = -1)
typ
typ '    PROGRAM TO TEST SEMPER HABILITIES...';typ;
typ 'If you do not want to see it, answer 0 to the first question.'
typ ; typ
typ 'If it is a new experiment, press 100 more pictures than you should...'
ask 'how many pictures will you get? ' npic
    !reads the keyboard once, and npic receives the value of
    ! the key pressed
if npic=0 return;
    ! in this case the program stops.
if npic=1 jump onlyone;
    ! if it is a single acquisition, it goes to a smaller loop
    ! than the whole program.
cre 101 siz 770,470 byte value 60
    ! creates an image at position 101, with background value 60.
tit 101 text 'd_____'
    ! to be fulfilled by the user - title of the experiment
if npic<100 jump another;
    ! it means that when npic>100, everything must be asked
    ! again, as the binocular gain, the pipette tip position,
    ! and so on.
fir =2;
    ! this is a flag to indicate that this first picture has
    ! already been acquired.
npic=npic-100;
    ! to begin a new experiment, the user had pressed 100 more
    ! numbers.
liv ;
    ! acquires image
cop dis to 1    ! copies the display to position 1 in memory
typ ;
ask 'Was the microscope x1 or x1.6? 1-->type 1, 1.6-->type 2    :! mic;
```

```

if mic=2 scr=150;
if mic=1 scr=100;
    !with 1.6, 1mm=150 pixels, more or less.
typ ;
his 1 to 100;
map 1 with 100 to 11 range 0,127;
dis 11
    ! enhancing contrasts...

typ 'You want to enter the pipette coordinates(0) or to mark it on the '
ask 'screen(1, default)? ' coo;
if coo=0 jump enter;
typ 'Go to the pipette...'; typ;
    ! and the user finds the tip.
xwi;
    ! this command returns in x and y the position of the cursor
typ 'The pipette is here: (x,y, in pixels) ', x,y;
pix =x;
piy =y;
jump okay;
enter:
ask 'x-coordinate : ' pix;
ask 'y-coordinate : ' piy;
okay:
dis 1;
    ! presents the original image again
mar pos pix,piy;

another:
    ! loop to get other images of the same experiment
ask 'You want a vertical(0) or horizontal(1, default) strip to be cut? ' str;
ask 'How big? (30 is a good choice)' larg;
    ! it's necessary to analyse where the wave comes from, and
    ! then choose 0 or 1, which will be applied to this particular
    ! wave we're seeing now.
for qua=1,npic;
    !it passes here npic times
if fir=2 jump wav;
liv
cop dis to qua
wav:
fir =1;
mar pos pix,piy;
typ ;
typ 'Go to the wave...'
    ! the wave front is clicked, preferentially at
    ! the closest point to the pipette tip
xwi ;typ; typ 'The wave is here: ',x,y;typ;
wvx =x;
wvy =y;
    ! now we evaluate the distances in pixels and in cm

```

```

! from the pipette tip to the wave front
dx =(wvx-pix)/scr;
dy =(wvy-piy)/scr;
!dtp =(((wvx-pix)^2)+(wvy-piy)^2)^0.5;
dsr =((dx^2)+(dy^2))^0.5;
dsr =(rou(dsr*100))/100;
!just adjusting dsr (real distance) to be truncated on the
!2nd decimal.
typ 'In number of pixels, the distance is: ',dtp;
typ 'The real distance is: ',dsr, ' mm'
! in order to evaluate the wave optical amplitude,
!we get samples of a pixel before and another after
! the wave
mwx =wvx-10;
nwx =wvx+10;
mwy =wvy-10;
nwy =wvy+10;
mpx =pix-5;
mpy =piy-5;
typ
typ 'Wave amplitude: ',p(mwx,mwy)-p(nwx,nwy);
typ
typ 'Wave amplitude on the pipette: ', p(mpx,mpy)-p(nwx,nwy);
! cutting a strip from the picture and pasting
! it on position 101:
if str=0 jump vrticl;
ext to 102 size 760,larg pos 0,piy mark dis;
jum steady;
vrticl:
ext to 102 siz larg,470 pos pix,0 mar dis;
cut 102 to 103 siz 480!
rot 103 ang -pi/2 !
dis 102 !
wai !
cut 103 to 102 siz 470,30 !
pas 102 to 101 pos (qua*70)-200,0
pro 102 to 20+qua hor ave;
jum oka;

steady:
wai
!because the strips have to be side by side
! on picture 101, we give this shift:
pas 102 to 101 pos 0,(qua*70)-200;
pro 102 to 20+qua ver ave;
oka:
dis 101
! now we project the selected strip vertically averaged:
ask 'Vertic. Average of the region? Type 1... ' ve;
if ve=1 jump gob;
ab =20+qua

```

```

sca ab to ab+10 byt
lme ab+10 to ab over 10
era dis
dis ab;
we=(nnn*10)+qua
wri ab format '(1X,I3)' nam 'pro',we
wai

```

```

gob:
loo qua;
nnn=nnn+1
out 101 nam 'qua',nnn
jum fim;

```

! the next one is the loop for acquiring only one picture
!it has no connections to the main part of the
!program, but is a simplified loop of the 'another'

```

onlyone;
era dis
liv
!cop dis to 10
typ ;
typ 'Go to the wave...'
xwi ;typ, typ 'The wave is here: ',x,y,typ;
wvx =x;
wvy =y;
dx =(wvx-pix)/scr;
dy =(wvy-piy)/scr;
dtp =(((wvx-pix)^2)+(wvy-piy)^2)^0.5;
dsr =((dx^2)+(dy^2))^0.5;
dsr =(rou(dsr*100))/100;

```

!just adjusting dsr (real distance) to be truncated on the 2nd decimal.

```

typ 'In number of pixels, the distance is: ',dtp;
typ 'The real distance is: ',dsr, ' mm'

```

```

fim:
end;

```

Apêndice 2. Subsídios aos resultados experimentais.

Tabelas e gráficos estatísticos.

R20	R23	R24
14.1	20.1	28.4
17.3	16.8	27.6
14.1	13.3	26.6
14.1	15.5	27.3
23.3	20.1	27.6
21.8	27.1	28
24.7	12.8	

Anova: Two-Factor Without Replication

SUMMARY	Count	Sum	Average	Variance
Column 1	7	129.4	18.4857143	21.9814286
Column 2	7	125.7	17.9571429	24.7395238
Column 3	6	165.5	27.5833333	0.37766667

ANOVA

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Columns	120.8725	2	60.43625	0.56965396	0.5783012	3.73889009

Tabela A2.1 - ANOVA aplicada a três conjuntos de dados obtidos a partir de retinas diferentes (R20, R23 e R24). Utilizamos como segundo fator a seqüência temporal de obtenção dos valores de pico da derivada. As tabelas da ANOVA são produzidas automaticamente pelo EXCEL 5.0.

Experimento	n	Amplitude		Velocidade		Duração		Pico (derivada)		Tp.der. - Tínicio		Tpico - Tp.der.	
		% cont.	95%	% controle	95%	% controle	95%	% controle	95%	% cont.	95%	% cont.	95%
barbital	7	111	28	118	32	82	22	146	80	86	17	72	18
bário	10	39	11	68	19	102	20	31	17	193	50	103	41
glicerol	11	45	15	-	-	88	22	67	42	117	58	94	32
propanol	12	39	16	92	11	63	22	40	20	124	56	59	18
propranolol	10	48	22	83	19	74	35	38	19	110	24	78	24
sódio	4	40	10	66	6	30	12	23	6	132	22	124	46

Tabela A2.2 - Resumo dos resultados normalizados, com $p < 0,05$. Para as 51 ondas controle, os valores médios são os seguintes: amplitude: 19 ± 1 mV, duração: 47 ± 15 seg, pico da derivada: 17 ± 8 mV/seg, intervalo entre o início da onda e o pico da derivada (Tp.der.-Tínicio): $4 \pm 2,8$ seg, intervalo entre o pico da derivada e o pico da onda elétrica (Tpico-Tp.der.): $3,2 \pm 0,9$ seg.

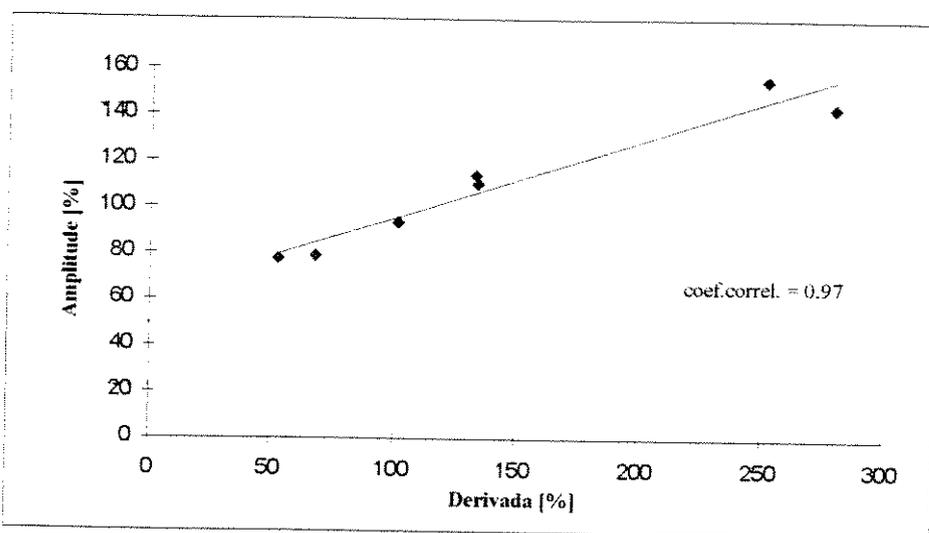


Figura A2.1 - Relação entre derivada e amplitude. Sódio-barbital, n=7.

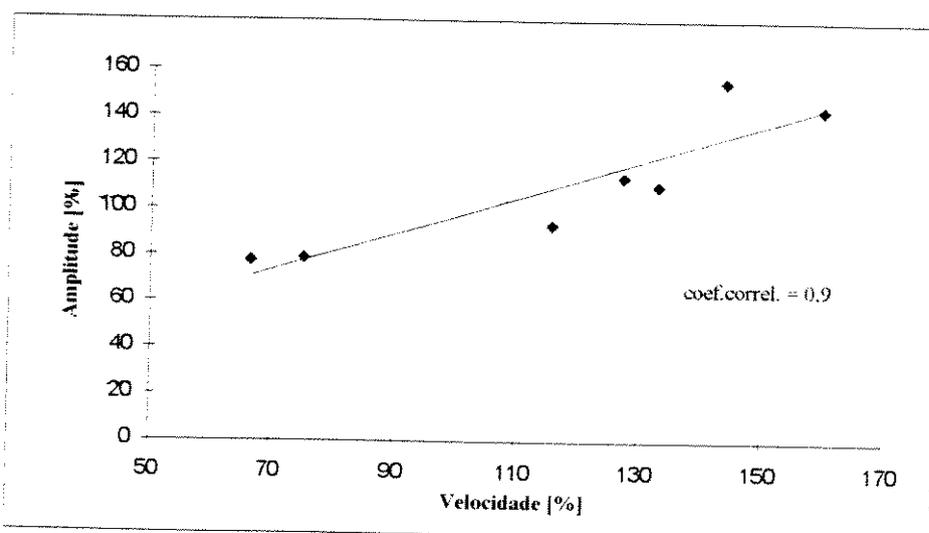


Figura A2.2 - Relação entre velocidade e amplitude. Sódio-barbital, n=7.

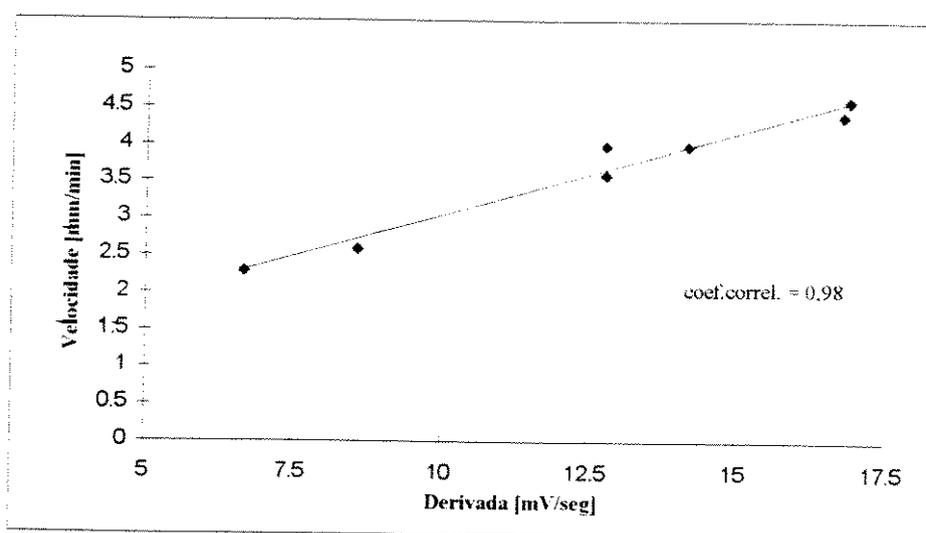


Figura A2.3 - Relação entre derivada e velocidade. Sódio-barbital, n=7.

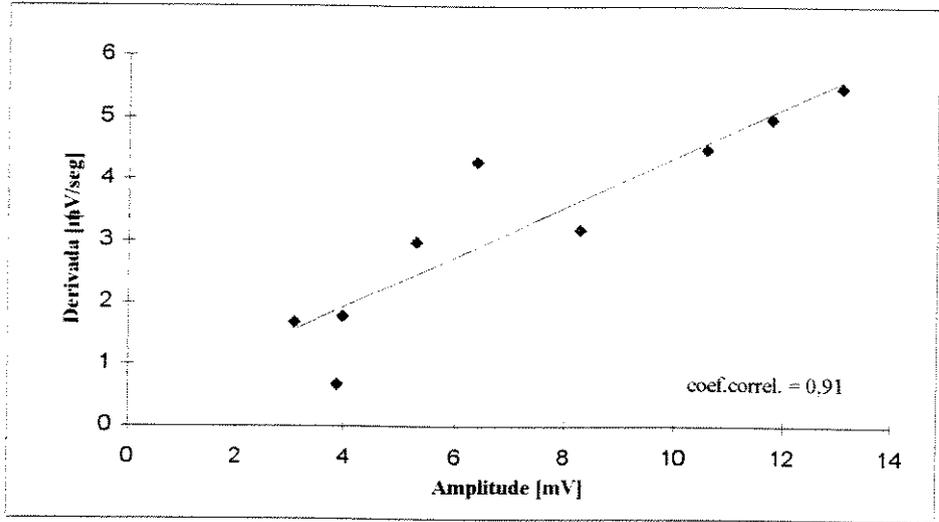


Figura A2.4 - Relação entre derivada e amplitude. Cloreto de bário, n=9.

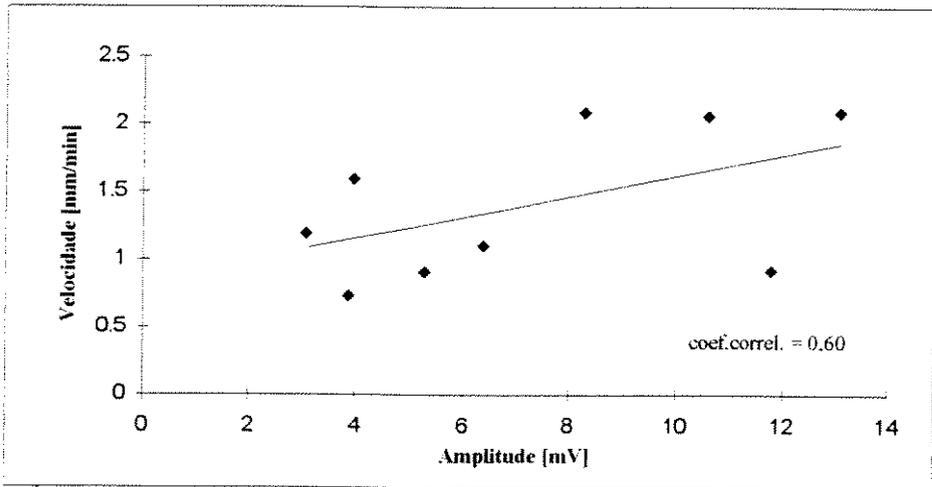


Figura A2.5 - Relação entre velocidade e amplitude. Cloreto de bário, n=9.

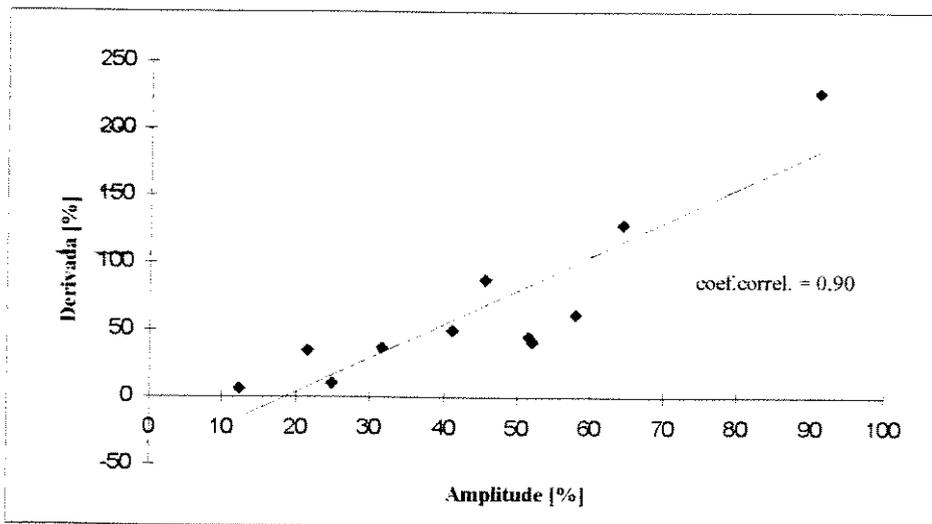


Figura A2.6 - Relação entre derivada e amplitude. Glicerol, n=11.

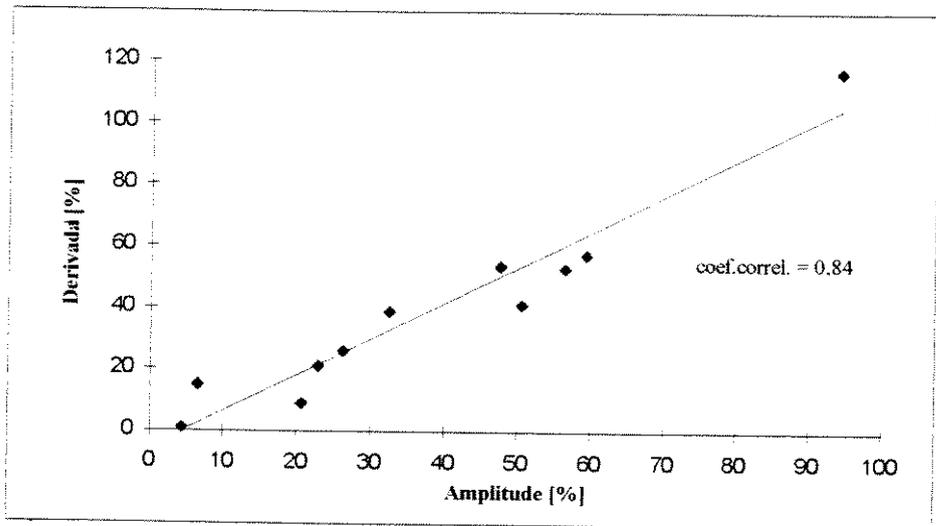


Figura A2.7 - Relação entre derivada e amplitude. Propranolol, n=12.

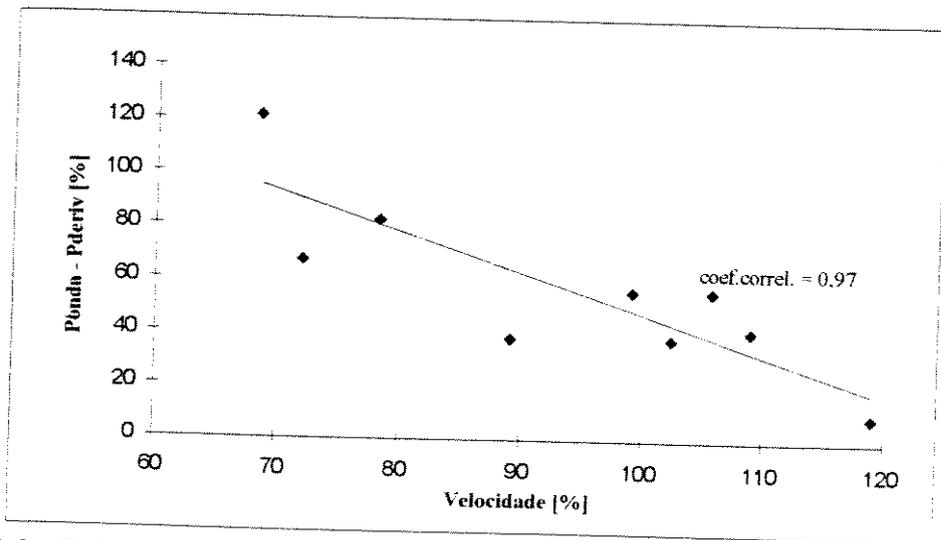


Figura A2.8 - Relação entre velocidade e intervalo entre o pico da onda e o pico da derivada. Propranolol, n=12.

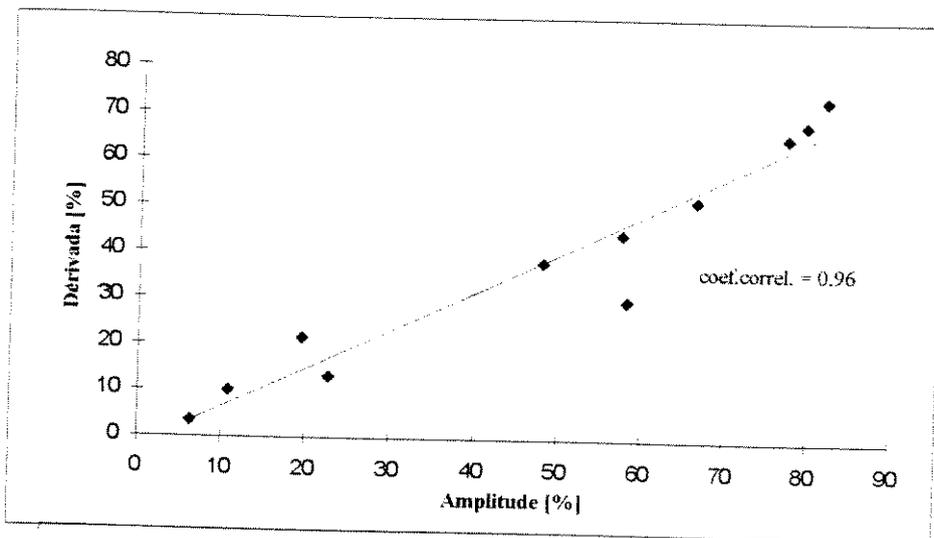


Figura A2.9 - Relação entre derivada e amplitude. Propranolol, n=10.

Estruturas moleculares.

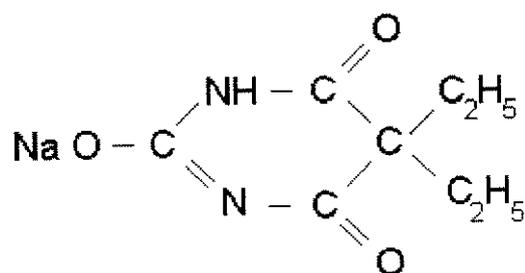
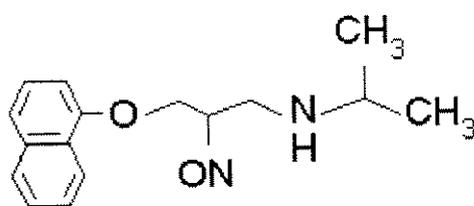


Figura A2.10 - Estrutura molecular do barbital sódico.



Propranolol (C₁₆H₂₁NO₂)

Figura A2.11 - Estrutura molecular do propranolol.

APÊNDICE 3. Autômato celular, exemplo de meio não-homogêneo (Mathematica 2.0)

(* Mathematica 2.0, arq. d1507ca1.m - ref. d1407ca7.m *)

```
ra1=3;      (* refratário absoluto; parte esquerda do meio [1]*)
rr1=1;      (* ref. relativo*)
ra2=2;      (* parte direita do meio [2]*)
rr2=1;
tha=50;     (* limiar para o primeiro estado refratário*)
thq=22;     (* menor limiar possível*)
r1=ra1+rr1; (* período refratário total *)
r2=ra2+rr2;
q=0;        (* estado quiescente*)
exc=1;      (* estado excitado *)
nmax=50;    (* ordem da matriz principal, que determina o tamanho do meio *)
wmax=11;    (* range da matriz de pesos *)
aprox=Table[0,{nmax},{nmax}];
            (* matriz de pesos: *)
w={{0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0},{0,0,1,2,3,3,3,2,1,0,0},
  {0,1,3,4,5,5,5,4,3,1,0},{0,2,4,6,7,8,7,6,4,2,0},
  {1,3,5,7,9,10,9,7,5,3,1},{1,3,5,8,10,0,10,8,5,3,1},
  {1,3,5,7,9,10,9,7,5,3,1},{0,2,4,6,7,8,7,6,4,2,0},
  {0,1,3,4,5,5,5,4,3,1,0},{0,0,1,2,3,3,3,2,1,0,0},
  {0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0}};
wf=Flatten[w];
For[po=6,po<=10,po++,aprox[[po,6]]=1];
      (* estímulo *)
a01=aprox;
      (* cálculo do limiar: *)
bth=(tha*r1-thq*ra1)/rr1;
dth=tha-thq;
```

```
th[x_]:=bth+((-dth/rr1)*x);
```

```
th[0]=0;
```

```
geracao=0;
```

```
For[ip=20,ip<30,ip++,For[jp=20,jp<30,jp++,aprox[[ip,jp]]=r+2]];
```

```
(* Loop Principal *)
```

```
While[geracao<20,
```

```
a=aprox;
```

```
(* cálculo do estado das células no lado esquerdo (1) do meio: *)
```

```
For[i=6,i<=(nmax-5),i++,
```

```
  For[j=6,j<=(nmax/2),j++,
```

```
    ra=ra1; rr=rr1; r=r1;
```

```
    ak=a[[i,j]];
```

```
    i1=Table[(i-(wmax+1)/2)+p,{p,wmax}];
```

```
    j1=Table[(j-(wmax+1)/2)+p,{p,wmax}];
```

```
    s=wf.Flatten[a01[[i1,j1]]];
```

```
    thx=th[ak];
```

```
    aprox[[i,j]]=Which[(ak==r+2),r+2,
```

```
                        ((ak<=ra)&&(ak>0))||((ak>ra)&&(ak<r)&&(s<=thx)),ak+1,
```

```
                        ((ak==0)||((ak>ra)&&(ak<=r)))&&(s>thx),exc,
```

```
                        (ak==0||ak>=r)&&(s<=thx),q
```

```
    ];
```

```
];
```

```
(* cálculo do estado das células no lado direito (2) do meio: *)
```

```
For[j=((nmax/2)+1),j<=nmax-5,j++,
```

```
  rr=rr2; ra=ra2; r=r2; ak=a[[i,j]];
```

```
  i1=Table[(i-(wmax+1)/2)+p,{p,wmax}];
```

```
  j1=Table[(j-(wmax+1)/2)+p,{p,wmax}];
```

```
  s=wf.Flatten[a01[[i1,j1]]];
```

```
  thx=th[ak];
```

```

aprox[[i,j]]=Which[(ak==r+2),r+2,
                  ((ak<=ra)&&(ak>0))|((ak>ra)&&(ak<r)&&(s<=thx)),ak+1,
                  ((ak==0)|((ak>ra)&&(ak<=r)))&&(s>thx),exc,
                  (ak==0|ak>=r)&&(s<=thx),q
                  ];
];
];

(* apresentacao grafica da matriz de estados (aprox) *)
Show[DensityGraphics[aprox,Frame->False,PlotRange->{0,r+2}]];

(* A barreira pode ser: *)
If[TrueQ[geracao==4],For[ik=6,ik<nmax/2,ik++,For[jk=6,jk<nmax-5,jk++,
                    aprox[[ik,jk]]=If[TrueQ[aprox[[ik,jk]==r+2],r+2,0]]]];

(* matriz das células excitadas (=1) e em outros estados (=0). *)
a01=Table[If[TrueQ[aprox[[i,j]]==exc],1,0],{i,nmax},{j,nmax}];
geracao++;
];

```

APÊNDICE 3. Exemplos de simulações do modelo baseado em autômatos celulares.

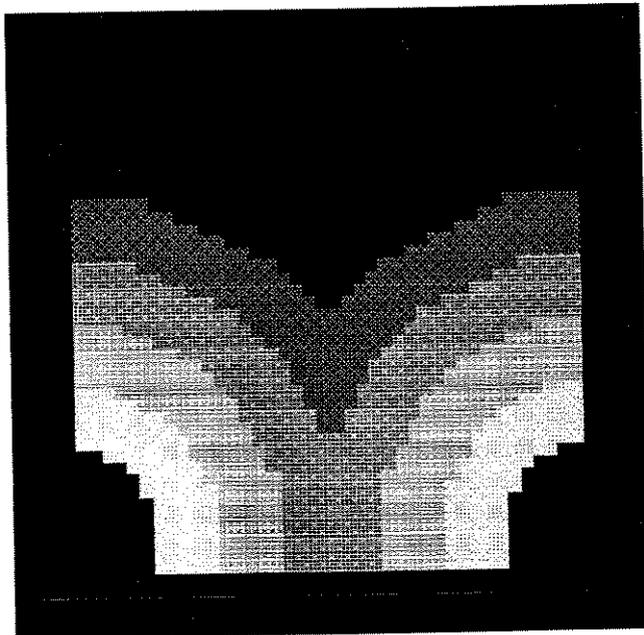


Figura A3.1 - Colisão entre ondas. (autômato celular)

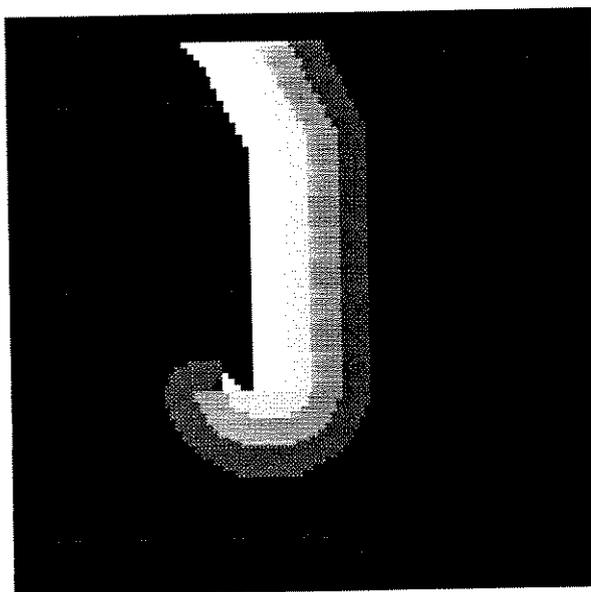


Figura A3.2 - Início de uma espiral, $ra=1$, $rr=2$, 12^a geração

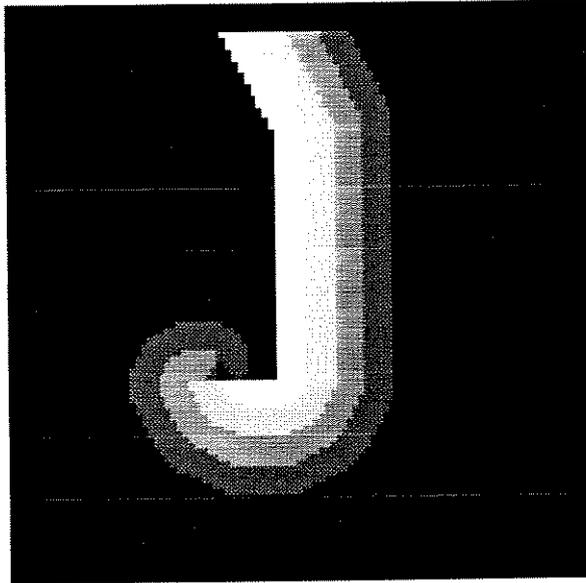


Figura A3.3 - Continuação da figura acima, 13ª geração

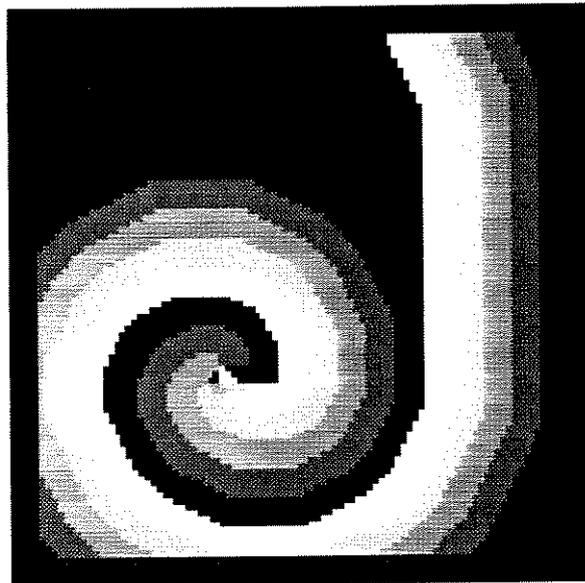


Figura A3.4 - Continuação da fig. anterior, 18ª geração

APÊNDICE 4. Implementação do modelo baseado em equações de reação-difusão (Turbo C 2.0)

```
#define kr      140.0 /* concentracao intra-celular de potassio no repouso*/
#define kecr   4.0   /* concentracao extra-celular de potassio no repouso*/
#define difk   0.12 /* parametro para a difusao do potassio */
#define m      30   /* tamanho da matriz que determina o meio (m x m) */
#define NCEL   25   /* numero de celulas na matriz referente ao meio */
#define cell   100  /* numero que determina que a celula eh neuronio*/
#define dex    1    /* quanto vale (em espaco) cada celula da matriz */
#define nger   1600 /* numero de geracoes a serem simuladas */
#define kest   40   /* concentracao de potassio para o estimulo*/
#define proces 13   /* numero de processos de cada celula glial */
#define pinta  0    /* se pinta=1 mostra a matriz de potassio*/
#define estimula 1 /* se estimula=0 nao estimula a matriz */
#define fgl    2.7  /* forca relativa da glia (canais e bombas)*/
#define fne    1.6  /* forca relativa da terminais sinapticos (canais e bombas)*/
#define bbgout 0    /* se bbgout=1 as bombas da glia nao funcionam*/
#define cangout 0   /* se cangout=1 os canais da glia nao funcionam*/
#define bbnout 0    /* se bbnout=1 sao tiradas as bombas dos neuronios*/
#define cannout 0   /* se cannout=1 os canais dos neuronios nao funcionam*/

#include <stdio.h>
#include <graphics.h>
#include <dos.h>
#include <math.h>

main()
{
/* Turbo C, versao 2.0 - implementacao das equacoes de reacao-difusao, d1901rd1.c*/
FILE *fopen(),*p1;
char s[10];
int y=1;
int cont,xc,vol;          /* contadores de loops */
int po,l,c,i,j;          /* contadores de loops */
```

```

double leakgl;          /* quantidade de potassio que sai da glia em regime*/
double q[m][m];        /* matriz com valores numericos que indicam as cels. gliais*/
double ne[m][m],kn[m][m]; /* matriz de neuronios e concentr. de potassio nos neur. */

double difec[4];       /* qtdade de potassio das quatro celulas vizinhas */
double kecx;           /* potassio extracelular calculado para a cel. i,j (x)*/
double pkec,dkec;
double tmp, calc[NCEL+1]; /* variaveis temporarias*/
double cang,k[NCEL+1],bbg; /* canais, concentracao de potassio e bombas para a glia*/
double cann,bbn;       /* canais e bombas de potassio nos terminais sinapticos*/
double prox[m][m],prk[NCEL+1]; /* valores de potassio a serem adicionados as matrizes
                                kn[m][m] e k[ncel+1] no fim de cada interacao*/
double vg[m][m], dvg[m][m]; /* potencial de membrana da glia*/
double regime;         /* valor de regime para cann-bbn*/
double vgr;            /* potencial da glia em repouso*/

graf();                /* inicializacao grafica*/
p1=fopen("d1601rd1.dat","w"); /* arquivo em que sao gravados os resultados da
                                simulacao*/
fprintf(p1,"1\t2\t3\t4\n"); /* primeira linha do arquivo*/

/** INICIALIZACAO DE MATRIZES **/
vgr=58*log10(kecr/kr);
    /* calculo do potencial de membrana para a glia*/

leakgl=0.8-kecr/(kecr+4);
    /* fluxo pela membrana glial, em regime*/

for(i=0;i<m;i++) for(j=0;j<m;j++)
    {prox[i][j]=0; vg[i][j]=vgr;q[i][j]=ne[i][j]=0;kn[i][j]=kecr;}
for(i=0;i<m-3;i=i+5) for(j=0;j<m-3;j=j+5)
    {
        ne[i][j+1]=ne[i][j+3]=ne[i+3][j]=ne[i+3][j+2]=cell;
        kn[i][j+1]=kn[i][j+3]=kn[i+3][j]=kn[i+3][j+2]=kr;
    }

```

```

for(i=4;i<m-1;i=i+5) for(j=4;j<m-1;j=j+5)
{
q[i][j]=q[i][j-2]=q[i][j+2]=q[i][j-4]=q[i][j+4]=y;
q[i-2][j-2]=q[i+2][j-2]=q[i+2][j+2]=q[i-2][j+2]=q[i-2][j]=y;
q[i+2][j]=q[i+4][j]=q[i-4][j]=y;
++y;
}
for(po=0;po<y;po++) k[po]=kr;
/* inicializacao das matrizes q, ne, kn, k e vg com numeros indicando
as celulas em cada elemento, a concentracao de potassio e o potencial de
membrana*/

/***** LOOP PRINCIPAL *****/
do
{xc=0;
do {
/** ESTIMULO **/
if ((estimula==1)&&(xc==200)) for(i=8;i<15;i++) for(j=10;j<15;j++)
{kn[i][j]=kest;
ne[i][j]=0;}

if (pinta==1) matr(kn,140,q,k); /* mostra as matrizes kn e k simultaneamente*/
for(i=0;i<m;i++) for(j=0;j<m;j++) {prox[i][j]=0;}
for(po=0;po<y;po++) {calc[po]=prk[po]=0;}

/***** GLIA *****/
/* apenas para as celulas gliais (q[i][j] diferente de 0) calcula-se a media do potassio extra-
celular, o potencial de membrana para aquela celula (q[i][j]) e a derivada da concentracao de
potassio como resultado do funcionamento das bombas e canais de potassio da glia. A
seguidor ajusta-se a concentracao de potassio de todas as celulas vizinhas que representem o
meio extra-celular e a celula q[i][j]*/
for(i=0;j<m-1;i++) for(j=0;j<m-1;j++)
{
if (q[i][j]==0) continue;
cont=0;

```

```

kecx=0;
if (ne[i+1][j]==0) {++cont; kecx+=kn[i+1][j];}
if (i!=0) if (ne[i-1][j]==0) {++cont; kecx+=kn[i-1][j];}
if (j!=0) if (ne[i][j-1]==0) {++cont; kecx+=kn[i][j-1];}
if (ne[i][j+1]==0) {++cont; kecx+=kn[i][j+1];}
if (cont!=0)
{
kecx/=cont;
if (kecx>=k[q[i][j]]) continue;
vg[i][j]=58*log10(kecx/k[q[i][j]]);
cang=0.8-0.01*(vg[i][j]-vgr);
bbg=kecx/(kecx+4);
if (bbgout==1)bbg=0.5;
if (cangout==1) cang=0.8;
dkec=fgl*(cang-bbg-leakgl);
prk[q[i][j]]+=(cont*dkec)/proces;
if (ne[i+1][j]==0) prox[i+1][j]-=dkec;
if (i!=0) if (ne[i-1][j]==0) prox[i-1][j]-=dkec;
if (j!=0) if (ne[i][j-1]==0) prox[i][j-1]-=dkec;
if (ne[i][j+1]==0) prox[i][j+1]-=dkec;
}
}
for(po=0;po<y;po++) {k[po]+=prk[po];
if (k[po]<1) k[po]=1;}

```

/****** TERMINAIS SINAPTICOS *****/

/* o mesmo procedimento adotado no caso da glia eh utilizado aqui, com a matriz ne, que indica os terminais sinapticos e meio extra-celular*/

```

for(i=0;i<m-1;i++) for(j=0;j<m-1;j++)
{
if (ne[i][j]==0) continue;
cont=0; kecx=0;
if (ne[i+1][j]==0) {++cont; kecx+=kn[i+1][j];}
if (i!=0) if (ne[i-1][j]==0) {++cont; kecx+=kn[i-1][j];}
if (j!=0) if (ne[i][j-1]==0) {++cont; kecx+=kn[i][j-1];}

```

```

if (ne[i][j+1]==0) {++cont; kecx+=kn[i][j+1];}
kecx/=cont;
tmp=5-log10(kecr/140)+log10((kecr+9)/180);
regime=5.8*tmp*((0.4*tanh(kecr-10))+2);
regime=regime-(29.5+0.4*(kecr*1950)/(1.5*(kecr*15)+60));
tmp=5-log10(kecx/kn[i][j])+log10((kecx+9)/(kn[i][j]+40));
cann=5.8*tmp*((0.4*tanh(kecx-10))+2);
bbn=29.5+(kecx*780)/((22.5*kecx)+60)+regime;
if (cannout==1) cann=0;
if (bbnout==1) bbn=0;
dkec=fne*(cann-bbn);
if (kecx>kn[i][j]) dkec=-1;
prox[i][j]-=dkec;
dkec/=cont;
if (ne[i+1][j]==0) prox[i+1][j]+=dkec;
if (i!=0) if (ne[i-1][j]==0) prox[i-1][j]+=dkec;
if (j!=0) if (ne[i][j-1]==0) prox[i][j-1]+=dkec;
if (ne[i][j+1]==0) prox[i][j+1]+=dkec;
}

```

/******DIFUSAO NO EXTRA-CELULAR******/

/* apenas para as celulas da matriz ne que representam o meio extra-celular, eh calculado o Laplaciano discreto (passivo) e os ajustes nas concentracoes de potassio para a celula do meio e seus quatro (no maximo) vizinhos sao feitos */

```

for(i=0;i<m-1;i++) for(j=0;j<m-1;j++)
{
if (ne[i][j]!=0) continue;
cont=0;
difec[0]=difec[1]=difec[2]=difec[3]=0;
if (ne[i+1][j]==0) {++cont; difec[0]+=kn[i+1][j];}
if (i!=0) if (ne[i-1][j]==0) {++cont; difec[1]+=kn[i-1][j];}
if (j!=0) if (ne[i][j-1]==0) {++cont; difec[2]+=kn[i][j-1];}
if (ne[i][j+1]==0) {++cont; difec[3]+=kn[i][j+1];}
pkec=0;
for(po=0;po<4;po++) pkec+=difec[po];
pkec=difk*(-kn[i][j]*cont+pkec);
}

```

```

        prox[i][j]+=pkec;
    }
    for(i=0;i<m;i++) for(j=0;j<m;j++) {
        if ((ne[i][j]!=0)&&(prox[i][j]>0)&&(kn[i][j]>kr+10))
            prox[i][j]=0;
        if (((i==0)||(j==0))&&(ne[i][j]==0))
            if ((prox[i][j]>0)&&(kn[i][j]>=kecr))
                {prox[i][j]=0;
                 }
            kn[i][j]+=prox[i][j];
            if (kn[i][j]<1) kn[i][j]=1;
        }
    fprintf(p1, "%ft%ft%ft%ft\n", kn[27][26], kn[10][7], kn[10][5], kn[10][9]);
    /* grava os valores numericos das celulas acima para o arquivo de dados */
xc++;
}
while(xc<nger);    /* as interacoes sao feitas nger vezes*/
    cleardevice();
    beep();        /* aviso sonoro - fim da simulacao */
    printf("\n Digite 3 se quiser continuar: "); /* para simular mais nger vezes */
    gets(s);
    cleardevice();
}
while(strcmp(s,"3")==0);
cleardevice();
closegraph();
fclose(p1);
}

```

```
/****** FUNCOES UTILIZADAS NO PROGRAMA *****/
```

```
/****** MATRIZES DESENHADAS *****/
```

```
matr(double des[m][m],int max, double xi[m][m],double ki[NCEL])
{
int i,j,p;
int style;
double passo;
static int oi[14]={8,1,2,3,4,5,7,9,10,11,12,13,14,15};
    /* desenha as matrizes des e ki na sequencia de cores acima, que eh a seguinte:
    8.cinza escuro, 1.azul escuro, 2.verde fosco (escuro), 3.azul fosco (escuro),
    4.vermelho, 5.roxo, 7.cinza claro, 9.azul-mar, 10.verde claro, 11.azul claro,
    12.vermelho claro, 13.rosa, 14.amarelo, 15.branco */
setcolor(15); rectangle(45,0,505,460);
passo=(max)/14;
for(i=0;i<m;i++)
    { for(j=0;j<m;j++)
        {
            if (des[i][j]==0) setfillstyle(EMPTY_FILL,0);
                else setfillstyle(SOLID_FILL,oi[(int)((des[i][j]-0.01)/passo)]);
            bar(50+15*j,5+15*i,50+(15*(j+1)),5+(15*(i+1)));
            if (xi[i][j]!=0) {setfillstyle(SOLID_FILL,oi[(int)((ki[xi[i][j]]-0.01)/passo)]);
            bar(52.5+15*j,7.5+15*i,62.5+(15*j),17.5+(15*i));}
        }
    }
}
```

```
/****** GRAFICOS *****/
```

```
graf()
```

```
{
```

```
/* inicializacao grafica*/
```

```
int driver,mo;
```

```
driver=VGA;
```

```
mo=VGAHI;
```

```
initgraph(&driver,&mo,"");
```

```
}
```

```
/****** BEEP *****/
```

```
beep()
```

```
{
```

```
/* soa tres apitos curtos*/
```

```
sound(523);delay(300);nosound();delay(500);
```

```
sound(523);delay(300);nosound();delay(500);
```

```
sound(523);delay(300);nosound();delay(500);
```

```
}
```