

FACILITAÇÃO NO FOTORRECEPTOR DE INSETOS

DORA FIX VENTURA

Depto. de Psicologia Experimental do Instituto de Psicologia da USP e Núcleo de Pesquisa em Neurociências e Comportamento da USP, Av. Prof. Mello Moraes, 1721 CEP 05508 - Cidade Universitária, São Paulo, Brasil

RESUMO

Uma revisão dos estudos de facilitação realizados com eletrorretinograma em insetos (Hymenoptera: Formicoidea) é apresentada mostrando que a resposta do olho à luz deve ser entendida como a resultante de dois processos opostos: facilitação e adaptação. Estes estudos levantaram as questões examinadas no presente trabalho: 1. se facilitação ocorre na célula fotorreceptora de insetos ou resulta da atividade de níveis mais proximais e 2. quais os mecanismos que explicam este fenômeno.

Respostas intracelulares de fotorreceptores de abelha sem ferrão *Melipona quadrifasciata* e do gafanhoto *Schistocerca sp.* foram estudadas com a finalidade de se determinar: a. o curso temporal da facilitação, com trens de pulsos apresentados em diferentes intervalos, ou variando-se a duração de um estímulo luminoso, b. o efeito da intensidade da luz, c. relação entre latência e facilitação e d. possíveis mecanismos: influências sinápticas, metarrodopsina, condições fisiológicas da preparação, mensageiro secundário (InsP3).

Os resultados mostraram que: 1. facilitação ocorre em fotorreceptores de insetos para estímulos de luz de alta intensidade e curta duração, sendo de maior amplitude no olho de gafanhoto que no de abelha 2. seu curso temporal é semelhante ao determinado anteriormente com o ERG, 3. não há relação entre amplitude e latência da resposta facilitada, 4. facilitação é diretamente proporcional ao pós-potencial hiperpolarizante que ocorre em resposta a estimulação intensa, 5. em experimentos realizados com a abelha *Melipona quadrifasciata* foram excluídas influências sinápticas, e também de metarrodopsina, ficou demonstrado que a facilitação não é devida à deterioração das condições fisiológicas, ao contrário, a facilitação desaparece nessas condições, e foram obtidos resultados inconclusivos com a administração de InsP3 e DPG.

Os resultados foram discutidos tendo em vista o conhecimento atual sobre transdução, que sugerem ser a facilitação devida a um acúmulo da substância transmissora na célula.

ABSTRACT

A revision of electroretinogram studies conducted in the eye of insects (Hymenoptera: Formicoidea) is presented showing that the response to light should be understood as a result of the action of two opposing processes: facilitation and adaptation. These studies raised the questions examined in the present work: 1. if facilitation occurs in insect photoreceptor cells and 2. what are the mechanisms that explain this phenomenon.

Intracellular responses of photoreceptors of the compound eyes of the stingless bee *Melipona quadrifasciata* and of the locust *Schistocerca sp.* were studied in order to determine: a. the time course of facilitation, with trains of light pulses presented at different interflash intervals, or varying the duration of a light stimulus, b. the effect of light intensity, c. the relationship between latency of the receptor potential and facilitation, and d. possible mechanisms: synaptic influences, metarhodopsin, physiological condition of the preparation, the second messenger InsP₃.

The results showed that 1. facilitation occurs in insect photoreceptors for light stimuli of high intensity and short duration, and it is greater in the photoreceptor of locusts than in the bee, b. its temporal course is similar to that found with the ERG, 3. there is no relationship between the amplitude and the latency of facilitated receptor potentials, 4. facilitation is directly proportional to the hyperpolarizing after potential found with high intensity illumination, 5. recordings in the eye of the bee *Melipona quadrifasciata* showed that synaptic and metarhodopsin influences can be excluded, and that facilitation is not due to impairment of the physiological conditions of the preparation, on the contrary, it disappears in those conditions. Experiments with InsP₃ and DPG yielded inconclusive results due to technical difficulties.

The results were discussed in the light of the present knowledge about transduction in photoreceptors, which suggest that facilitation could be due to an accumulation of the second transmitter in the cell.

1. SENSIBILIDADE: FACILITAÇÃO E ADAPTAÇÃO

A sensação de ofuscamento após exposição à luz intensa como a de um flash fotográfico é uma experiência que todos conhecemos. Sabemos também que o efeito ofuscante de tal exposição se esvai gradualmente com o tempo e a sensibilidade é recuperada depois de um intervalo. Medidas precisas destas mudanças foram feitas tanto em seres humanos (para revisões v. Bartlett, 1965; Barlow, 1972) como em muitas espécies de vertebrados (Granit, 1955; Normann e Werblin, 1974) e invertebrados (Fuortes e Hodgkin, 1964; Srebro e Behbehani, 1974; rev. em Autrum, 1981).

A explicação dos mecanismos responsáveis pela direção, quantidade e curso temporal das mudanças de sensibilidade acarretadas pela exposição à luz tem motivado diferentes interpretações, que variaram ao longo dos últimos 50 anos com os rápidos progressos verificados no conhecimento psicofísico, eletrofisiológico e bioquímico do

funcionamento do sistema visual (rev. Barlow, 1972; Autrum, 1981). Inicialmente a recuperação de sensibilidade no escuro, após a adaptação à luz, era atribuída à regeneração de fotopigmentos (Hecht, 1934; 1937). Descoramento e regeneração do fotopigmento permitiam explicar a direção e curso temporal das mudanças de sensibilidade na adaptação à luz e ao escuro, mas não a magnitude dessas mudanças, muito maior do que a variação de concentração dos fotopigmentos.

A relação entre sensibilidade e concentração de fotopigmentos encontrada em medidas diretas de concentração de rodopsina no olho humano intacto é logarítmica (Rushton, 1961a, b) e não linear, como uma hipótese fotoquímica simples requereria. Tanto esta discrepância, como as descobertas psicofísicas de que a adaptação de uma área da retina podia afetar o estado de outra (e.g. Lipetz, 1961; Rushton e Westheimer, 1962) colocaram em evidência a importância dos fatores neurais na adaptação e deslancharam a busca de fatores de ganho para explicar as diferenças entre mudanças de fotopigmento e de sensibilidade.

Novas teorias que levavam em conta a interação retiniana foram formuladas (Barlow, 1964; Rushton, 1965), e diferentes concepções de funcionamento do receptor emergiram, principalmente seguindo o modelo proposto por Fuortes e Hodgkin (1964). Este modelo supõe que o fotorreceptor tenha um mecanismo de controle de ganho, o qual, como visto em *Limulus*, deve ser neural dada sua velocidade de ação, e não um aspecto da regeneração da rodopsina, que é um processo lento. Neste modelo o fotorreceptor estaria atuando como um filtro elétrico de vários estágios, com um mecanismo de retroalimentação da saída para cada um dos estágios. O modelo propunha uma relação causal entre redução de sensibilidade devida à adaptação à luz e compressão temporal da resposta do receptor. Isto permitia explicar o fato de que a resolução temporal é melhor no estado adaptado à luz do que no escuro, como foi medido em seres humanos (Lythgoe e Tansley, 1929; Ventura, 1968) e em preparações no olho do gato (Enroth, 1952).

Ficou para a década de 80 o esclarecimento do primeiro fator de ganho cujo cálculo tornou-se possível com a elucidação recente tanto em vertebrados (Stryer, 1986) como em invertebrados (e.g. Devary et al, 1987) da cascata de transdução bioquímica no fotorreceptor. A cascata estabelece os elos de ligação entre a recepção de luz pelo fotopigmento e a sua consequência neural na membrana do fotorreceptor. Foi desvendada a existência de transmissores ou mensageiros dentro da célula fotorreceptora e estes estão sendo identificados. Os candidatos mais prováveis são GMPc (guanosina 3'5' monofosfato cíclico) e InsP3 (inositol 1'4'5' trisfosfato), respectivamente no vertebrado (Pugh e Cobbs, 1986; Lamb, 1986; Stryer, 1986) e invertebrado (Devary et al., 1987) (v. Discussão). Os cálculos dos bioquímicos são de um ganho de 1 para 10.000 entre a ativação de uma molécula de rodopsina e o número de canais de Na⁺ modificados na membrana (Stryer, 1986). Estes resultados mostram o fator de ganho existente no próprio mecanismo de transdução. Além deste existem outros fatores de ganho (ou

redução) da rede neural tanto na cadeia sináptica do receptor aos centros neurais superiores, como nas ligações laterais ou horizontais existentes nas várias camadas (rev. em Laughlin, 1980).

Em contradição com a idéia prevalescente de que exposição à luz causa redução de sensibilidade está entretanto o achado recente de que esta não é uma consequência necessária da exposição à luz: o contrário também pode ocorrer. Aumento de sensibilidade ou facilitação de sensibilidade foi pela primeira vez descrito por Ruck e Jahn (1954) no olho composto de um pequeno crustáceo, *Lygia occidentalis*, e posteriormente confirmado por vários autores que mostraram facilitação nos olhos de algumas outras espécies de invertebrados e também na retina de um vertebrado (*Rana catesbiana*, Azuma e Azuma, 1979). Pesquisadores que relataram este efeito surpreendente da adaptação à luz não esconderam sua perplexidade. A mais enfática destas descrições é dada por Hartline e Lange (1974) que dizem que "a presença de facilitação viola as expectativas razoáveis de qualquer um que tenha familiaridade com a literatura psicofísica e fisiológica sobre visão. O resultado habitual de um experimento de dois pulsos no sistema visual de vertebrados ou invertebrados deveria ser uma redução da resposta ao segundo pulso de luz, a qual diminui com o aumento do intervalo."

A evidência presente para a existência de facilitação é certamente sólida, pois o efeito foi confirmado em vários laboratórios, em diferentes espécies, e através de registro em vários níveis do sistema visual. Um resumo desses relatos consta da Tabela I.

2. ESTUDOS COM ELETORRETINOGRAMA

Em nosso laboratório facilitação foi observada num primeiro momento, na década de 70, através do eletrorretinograma obtido no olho da formiga *Atta sexdens*. Algumas medidas iniciais mostraram que as características observadas por Ruck e Jahn (1954) estavam presentes nessa preparação (Ventura *et al.*, 1976). Esses primeiros experimentos consistiram em medir o efeito como função do número de pulsos apresentado ao olho, de intervalo entre pulsos, e do nível de intensidade da luz, utilizando o ERG.

A preparação era muito simples, estável e permitia experimentos de longa duração. Uma formiga forrageadora de tamanho grande da espécie *Atta sexdens* (cerca de 10 mm de comprimento) era imobilizada com fita adesiva nas patas e parafina na cabeça. Eletrodos de aço inoxidável eletroliticamente afinados eram inseridos, um logo abaixo da córnea, e o outro (de referência) na parte látero-posterior da cabeça. Eletrodos de algodão umedecido foram usados nos primeiros experimentos. Equipamento eletrofisiológico convencional de registro completava a aparelhagem (Ventura *et al.*, 1976).

A preparação era colocada numa cabina escura, dentro da qual a luz para estimulação era trazida através de uma fibra óptica com um sistema de lente na extremidade final, que permitia focalização no olho do inseto. Intensidade e duração da luz eram

Tabela 1 - Relatos de Facilitação

Espécie	Tipo de Registro	Variáveis manipuladas	Autores
<i>Lygia occidentalis</i>	ERG	I, IE	Ruck and Jahn, 1954
<i>Schistocerca gregaria</i>	ERG	*	Giulio e Lucaroni, 1967
<i>Balanus amphitrite</i>	ERG	I	Stratten e Ogden, 1971
<i>Lycosa baltimoriana</i>	IC	IP	Devoe, 1972
<i>Balanus eburneus</i>	IC	**	Shaw, 1972
<i>Oncopeltus fasciatus</i>	ERG	**	Dudek e Koopowitz, 1973
<i>Sarcophaga bullata</i>			
<i>Loligo opalescens</i>	ONF	IE, IF	Hartline e Lange, 1974
<i>Oncopeltus fasciatus</i>	ERG	IE, T	Dudek, 1975
<i>Balanus amphitrite</i>	IC	I, IE, Ca^{2+}	Hanani e Hillman, 1976
<i>Atta sexdens</i>	ERG	I, IP, IE	Ventura <i>et al.</i> , 1976
<i>Menemerus confusus</i>	ERG e IC	I, D, IE	Yamashita e Tateda, 1976
<i>Atta sexdens</i>	ERG	I, D, IE, IF	Ventura e Puglia, 1977
<i>Balamus eburneus</i>	IC	M	Hanani e Hillman, 1979
<i>Phalangium opilio</i>	ERG	D, IE	Lovisol e Busso, 1979
<i>Rana catesbiana</i>	ERG	I, IE, Ca^{2+}	Azuma e Azuma, 1979
<i>Blanus eburneus</i>	IC	CD, Ca^{2+}	Bolsover, 1980
<i>Atta sexdens</i> , <i>Camp-notus crassus</i> , <i>Pseudo-myrmex adustus</i>	ERG	IE, D	Ventura, 1983
<i>Balamus eburneus</i>	IC	Ca^{2+} ext, L	Hanani, 1986
<i>Melipona quadrifasciata</i> , <i>Schistocerca sp.</i>	IC	IP, D, M, I	Ventura, este trabalho

Abreviações:

CD - corrente despolarizante; DPG - difosfoglicerato; D - duração; ERG - eletrorretinograma; I - intensidade; IC - intracelular; IE - intervalo no escuro; IF - intensidade de fundo; IP - intervalo entre pulsos; INSP3 - inositol trisfosfato; L - medidas de latência; ONF - registro no nervo óptico; M - Metadorrodopsina; PHA - pós-potencial hiperpolarizante prolongado.

* - Remoção dos gânglios ópticos, administração de nicotina e de Ach;

** - O efeito foi apenas relatado.

controladas por meio de filtros neutros e um obturador fotográfico. A fonte luminosa era uma lâmpada halógena de tungstênio (Osram 58.8105; 100W). O valor da intensidade máxima usada, calibrado na posição ocupada pelo olho, era de 5.1 mW/cm^2 .

A Figura 1 ilustra um resultado típico de facilitação neste inseto. O registro à esquerda mostra um ERG de um olho adaptado ao escuro em resposta a um pulso de luz de 200 ms com intensidade máxima. O ERG da direita, para a mesma intensidade de luz foi obtido 5s depois de o olho ter sido submetido a um trem de dez flashes apresentados com intervalo curto (0.5 s), na mesma intensidade. O aumento de amplitude é muito obvio e deve-se também notar que se restringe a um componente do ERG, a onda b.



FIGURA 1 - Eletroretinogramas (ERGs) obtidos no olho composto de *Atta sexdens* no estado adaptado ao escuro (*lado esquerdo*) e adaptado à luz (*lado direito*), em resposta a um pulso de luz de 200 ms de duração e 5.1 mW/cm^2 de intensidade. O ERG do lado direito foi obtido 5s depois de apresentar-se um trem de dez pulsos de luz com intervalos de tempo curtos (0.5s) entre os pulsos. Calibração: 2 mV e 100 ms. Traços superiores são respostas de uma fotocélula ao estímulo luminoso. (Puglia, 1975)

2.1 TRENS DE PULSOS

Para observar o curso temporal da facilitação vários trens de pulsos de luz (cada pulso com 40 ms de duração, e o intervalo entre pulsos variável de um trem para outro), na intensidade máxima, foram apresentadas ao olho adaptado ao escuro. A Figura 2

apresenta os ERGs obtidos, mostrando que a facilitação pode ser exibida com diferentes magnitudes em todos os intervalos entre pulsos (IFIs). Para os mais longos era muito pequena, e para os mais curtos, precedida de inibição. O curso temporal médio de desenvolvimento e queda de facilitação para quatro preparações pode ser observado na Figura 3. O gráfico da esquerda mostra porcentagem de redução ou aumento do ERG da segunda resposta relativo ao da primeira, em função do IFI. O gráfico da direita mostra a porcentagem de redução ou aumento do ERG da resposta estável, obtida após pelo menos quatro estimulações, relativa à resposta ao primeiro pulso de luz. Ambos gráficos mostram que nos IFIs mais curtos ocorre redução do ERG, ou adaptação. Esta redução não é tão evidente no potencial estável como na segunda resposta. À medida que o IFI aumenta, a facilitação também aumenta e depois decresce, desaparecendo com IFIs de cerca de 10s. Qualquer que seja o valor facilitado atingido, este permanece constante em seqüências longas de pulsos.

Ficou também claro que o efeito de facilitação não é devido à sincronização da resposta com os estímulos intermitentes. Uma comparação dos efeitos produzidos por uma seqüência de pulsos com o produzido por uma luz de adaptação longa com aproximadamente a mesma energia total aparece na Figura 4. Como se pode ver um valor de facilitação semelhante é obtido os dois casos.

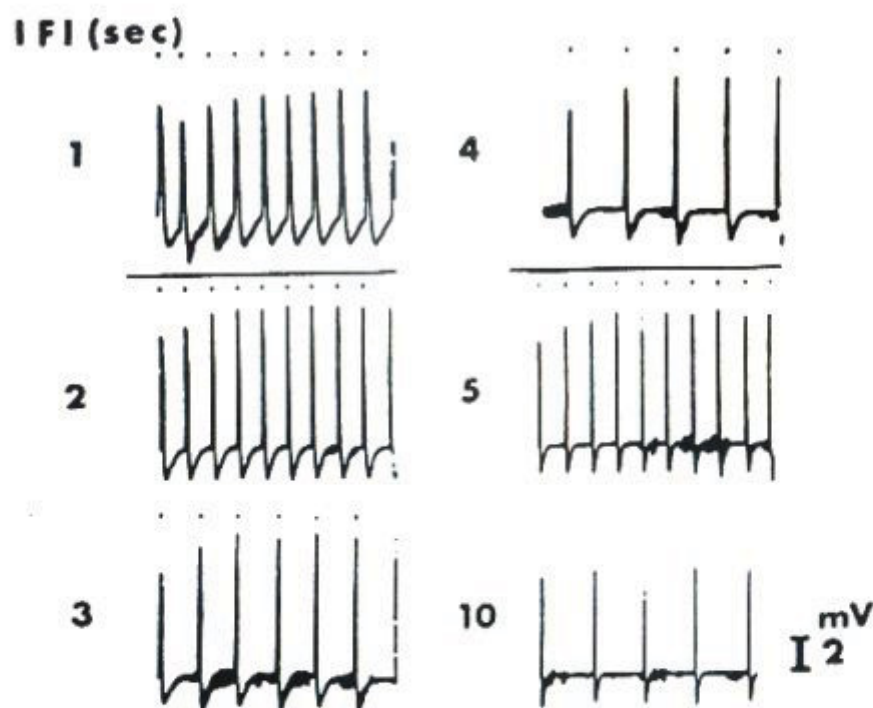


FIGURA 2 - Trens de pulsos de 40 ms apresentados com 1, 2, 3, 4, 5 e 10s de intervalo entre pulsos. (Ventura, Martinoya, Bloch e Puglia, 1976)

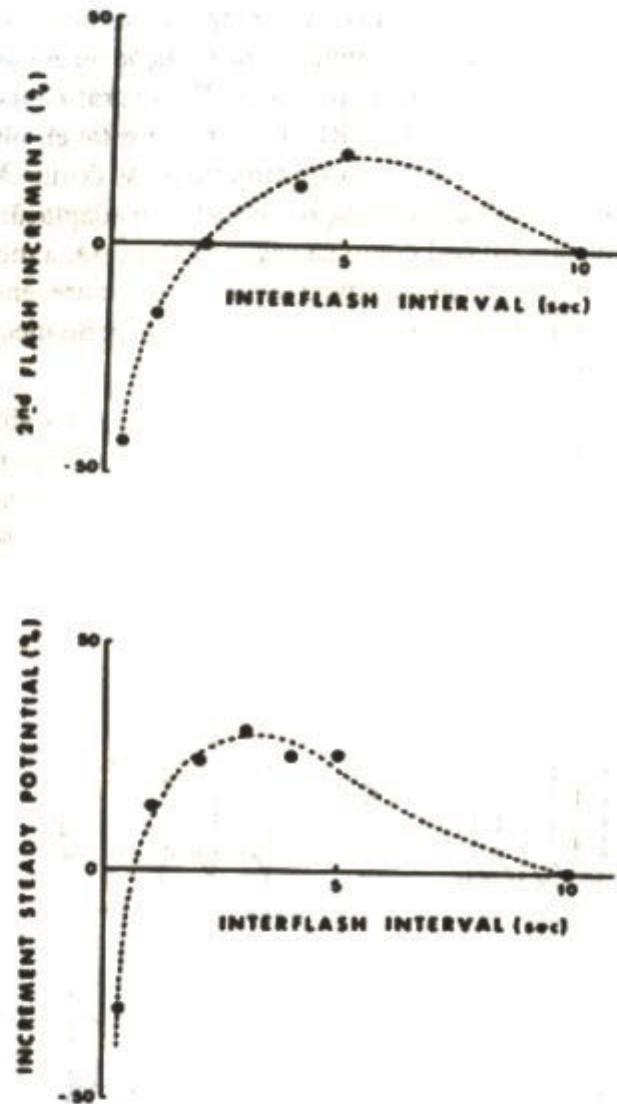


FIGURA 3 - Curso temporal médio de desenvolvimento e desaparecimento de facilitação. *Curva da esquerda:* porcentagem de decremento ou incremento da resposta ao segundo sobre a resposta ao primeiro pulso. *Curva da direita:* porcentagem de decréscimo ou aumento do potencial estável relativo à resposta ao primeiro pulso. (Ventura et al., 1976).

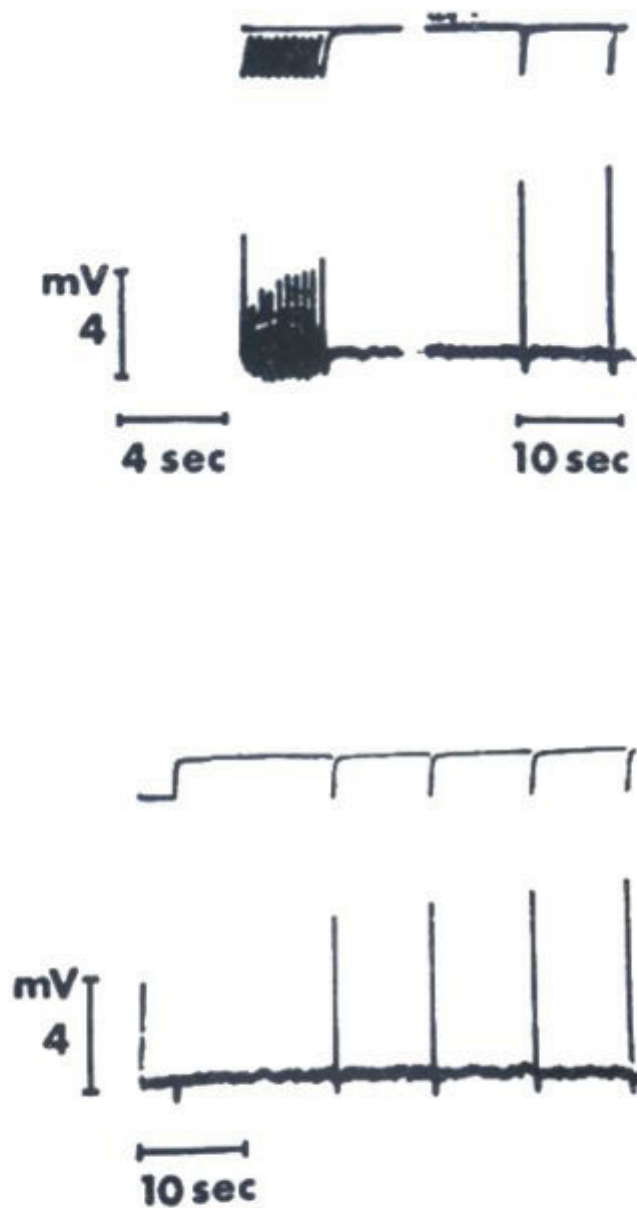


FIGURA 4 - *Registros superiores*: ERGs em resposta a trem de pulsos com 400 ms de intervalo entre pulsos, seguido por pausa e dois pulsos de teste. *Registros inferiores*: iluminação contínua durante 3s com energia total equivalente à do trem de pulsos acima. Depois de uma pausa, o pulso de teste e 3 pulsos com intervalo de 10s foram apresentados. Traçados superiores em cada figura são respostas de uma fotocélula aos estímulos luminosos. (Ventura *et al.*, 1976).

2.2 VARIAÇÃO DE DURAÇÃO E INTENSIDADE DA ADAPTAÇÃO À LUZ

Esta última observação sugeriu uma análise quantitativa do fenômeno, que foi feita variando-se sistematicamente as condições de estimulação. Como uma descrição abrangente do fenômeno de facilitação não existia na literatura, os experimentos seguintes tiveram por objetivo conhecer mais sobre facilitação através da determinação paramétrica das condições de estimulação necessárias para seu aparecimento. Havia um interesse específico em comparar condições que produziam facilitação com as que produziam adaptação pois uma descrição dos parâmetros associados com os dois resultados poderia auxiliar a levantar hipóteses sobre a origem dos mecanismos envolvidos - se a mesma ou diferente.

Os experimentos empregaram uma sequência estimulatória que consistia em um pulso de luz de controle (S_c) seguido após 5s por um pulso de adaptação (S_{ad}), e um de teste (S_t) apresentado em um intervalo especificado após S_{ad} , todos apresentados na mesma intensidade. Uma descrição esquemática do programa de estimulação usado para cada experimento é apresentada na Figura 5.

A dependência de facilitação e adaptação com relação à intensidade e duração da exposição à luz foi investigada em três preparações, seguindo o esquema apresentado na linha superior do diagrama da Figura 5. Este consistia em variar a duração de S_{ad} e apresentar a sequência estimulatória em vários níveis de intensidade. Neste e nos experimentos seguintes um intervalo de 3 min no escuro separava as sequências estimulatórias. Respostas a S_c permitiam uma avaliação da estabilidade da preparação. Flutuações não excediam 2% num período de 6 ou 7 horas de registro.

Os resultados obtidos estão expressos na Figura 5 em termos de aumentos ou diminuições do ERG em resposta a S_t relativos à resposta ao controle (S_c), em função da duração e exposição à luz. A facilitação máxima aparece nas durações mais curtas de adaptação e é deslocada em direção às durações mais curtas à medida que a intensidade aumenta. Nas intensidades mais altas a facilitação atinge os maiores valores ou seja chega a 50% de aumento relativo à amplitude controle.

As amplitudes do ERG não indicam diretamente a sensibilidade da retina. A sensibilidade é definida como a recíproca da intensidade necessária para evocar uma resposta constante. Para avaliar o aumento ou diminuição de sensibilidade a S_t em relação à verificada para S_c é necessário recorrer à função $V/\log I$ (que relaciona amplitude da resposta com intensidade da luz) para o olho adaptado ao escuro (respostas a S_c). Se a resposta a S_t é maior que a S_c (facilitação) ou menor (adaptação) pode-se usar a função $V/\log I$ para avaliar a diferença (aumento ou diminuição) de intensidade necessária para igualá-la à resposta a S_t . A variação de sensibilidade é igual à recíproca dessa diferença.

Este procedimento foi aplicado aos dados da Figura 5 os quais foram reapresentados na Figura 6 na qual cada curva corresponde a uma duração de adaptação. A ordenada indica aumento ou redução de sensibilidade da resposta adaptada à luz, relativo à resposta adaptada ao escuro. Na abcissa cada intervalo escalar corresponde a uma unidade logarítmica. As curvas estão deslocadas na abcissa para facilidade de apresentação.

Dois aspectos dessas funções são relevantes para a compreensão de facilitação. O primeiro é que funções totalmente opostas são encontradas nas durações extremas, como se processos separados tivessem sido isolados. Na duração mais curta de S_{ad} a sensibilidade sempre aumenta com a intensidade da luz, enquanto nas durações mais longas a sensibilidade sempre diminui com o aumento da intensidade. O segundo aspecto a ser ressaltado nestas curvas é o de que a extensão das mudanças de sensibilidade coberta por estas funções opostas é mais ou menos a mesma, ou seja, 2 log. Em durações intermediárias uma combinação dos dois efeitos aparece em cada função.

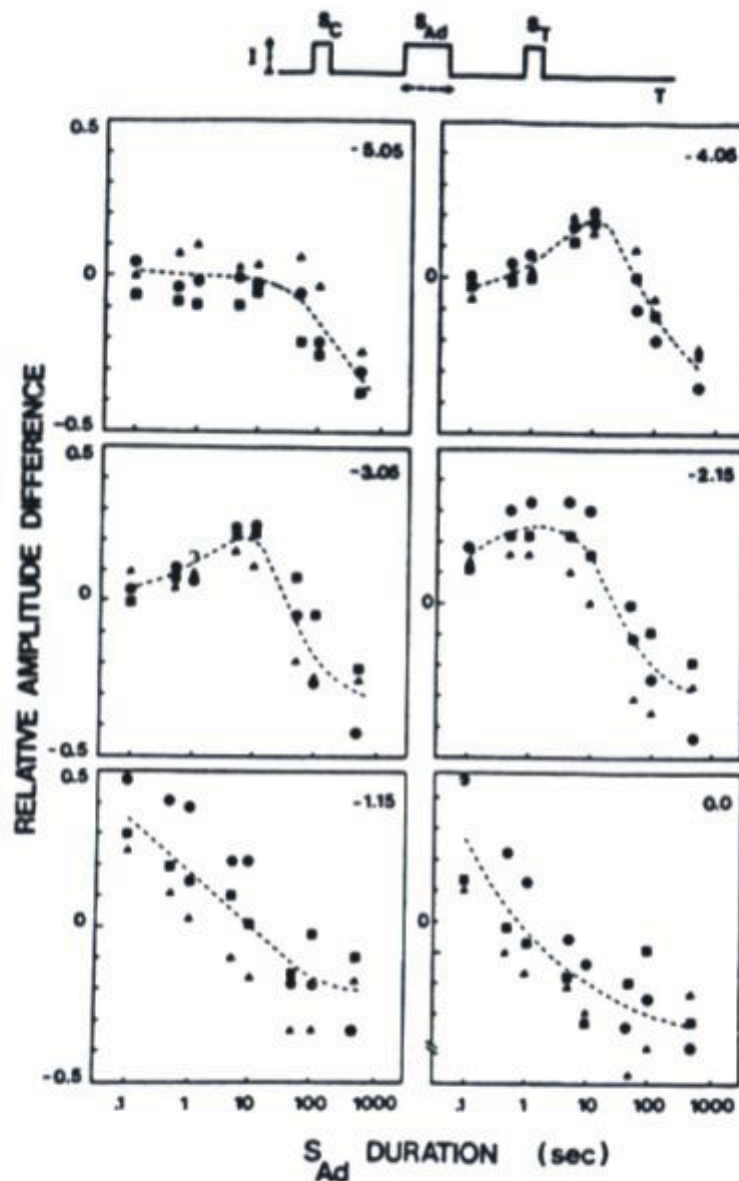


FIGURA 5 - Diferenças relativas de amplitude entre ERGs adaptados à luz e ao escuro, em função da duração de adaptação, para várias intensidades. A intensidade máxima ($\log I=0$) foi reduzida pela atenuação indicada em cada gráfico. Diferentes símbolos indicam diferentes preparações. O diagrama superior mostra a sequência de estimulação. (Ventura e Puglia, 1977).

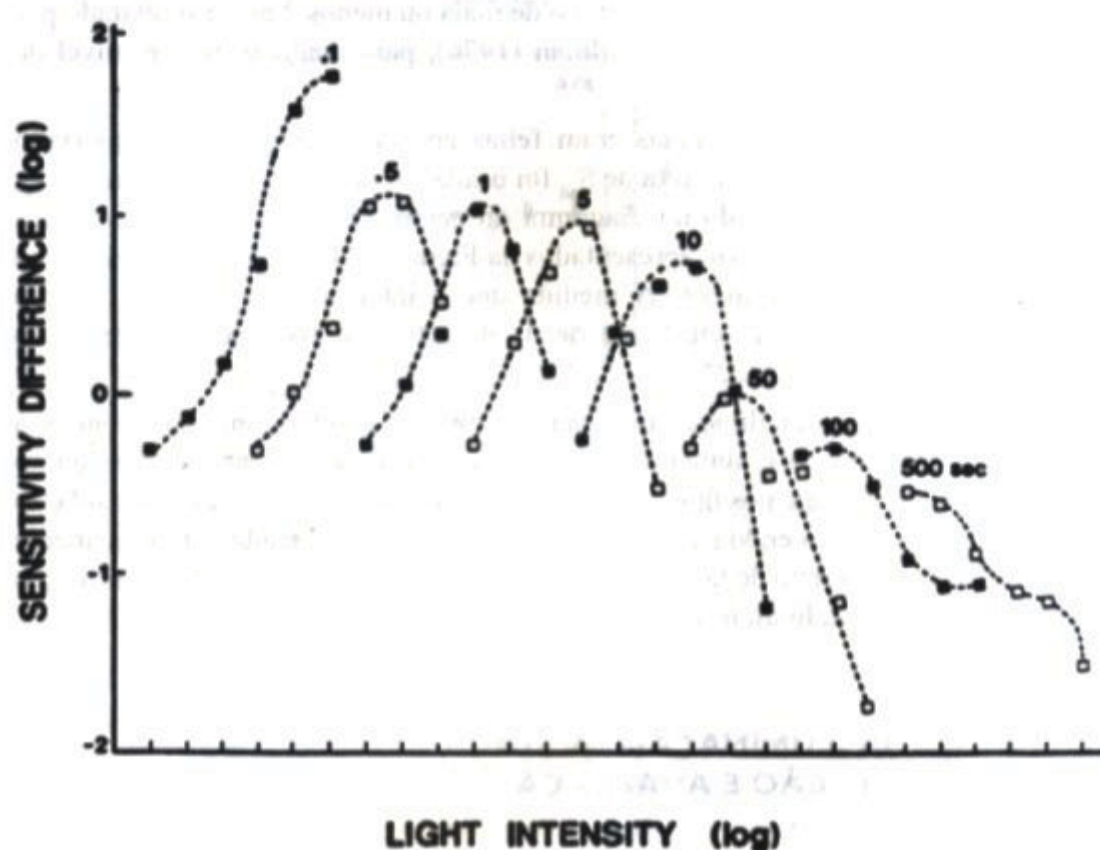


FIGURA 6 - Diferenças de sensibilidade visual entre amplitudes de ERG adaptados à luz e ao escuro, em função de intensidade, para diferentes durações de adaptação. Duração de S_{Ad} é indicada pelo número ao lado de cada curva. Os pontos são médias de três preparações. Cada divisão do eixo de intensidades corresponde a 1 log. As curvas estão deslocadas na abscissa para tornar mais clara a apresentação. (Ventura e Puglia, 1977)

2.3 CURSO TEMPORAL DE ADAPTAÇÃO E FACILITAÇÃO

O fenômeno de facilitação em experimentos anteriores mostrou-se como um efeito de duração relativamente longa. Um período de mais ou menos 2 min foi relatado por Ruck e Jahn (1954) e por Hanani e Hillman (1976), para medidas em um nível de intensidade.

No presente trabalho as medidas eram feitas em várias intensidades, cobrindo uma faixa de 5 log. Uma duração fixa de S_{ad} foi usada e o intervalo no escuro entre S_{ad} e S_i foi variado, como indicado no diagrama do centro da Figura 5. Os resultados obtidos com três preparações são apresentados na Figura 7. Na intensidade mais baixa nenhum dos dois efeitos aparece. À medida que a intensidade aumenta, maior a facilitação, com um máximo em torno de 4s de intervalo no escuro decrescendo gradualmente até 100 s.

O deslocamento da facilitação máxima em direção a intervalos mais longos à medida que a intensidade é aumentada poderia ser explicado se supusermos que o processo inibitório que age nos intervalos mais curtos e que só é visto nas intensidades mais altas, estaria já crescendo nas intermediárias. Mesmo não sendo suficientemente grande para superar o efeito de facilitação, exceto nas intensidades mais altas, sua ação estaria presente, causando diminuição da quantidade de facilitação.

2.4. EFEITOS DA ILUMINAÇÃO DE FUNDO NA FACILITAÇÃO E ADAPTAÇÃO

Os dados obtidos em diferentes níveis de iluminação de fundo também sugerem a existência de dois diferentes processos para facilitação e adaptação, uma vez que diferentes características foram encontradas para os dois efeitos. A Figura 8 mostra os efeitos de variação na iluminação de fundo numa faixa de 3 log, sobre a resposta facilitada (gráfico superior) ou inibida (gráfico inferior). À medida que a intensidade de fundo aumenta, ambos os efeitos gradualmente desaparecem, e a mesma faixa de intensidades anula os dois fenômenos. Diferenças podem ser notadas nas intensidades de fundo baixas. A quantidade de facilitação parece aumentar, em vez de diminuir, com fraca iluminação de fundo, em comparação com o resultado obtido sem iluminação de fundo (v. NB, Figura 8). O que de fato acontece é que a resposta ao S_c é afetada por estas intensidades de fundo, e diminui, enquanto a resposta facilitada não é afetada. Esta ausência de efeito do fundo nas intensidades mais baixas não é observada na resposta inibida.

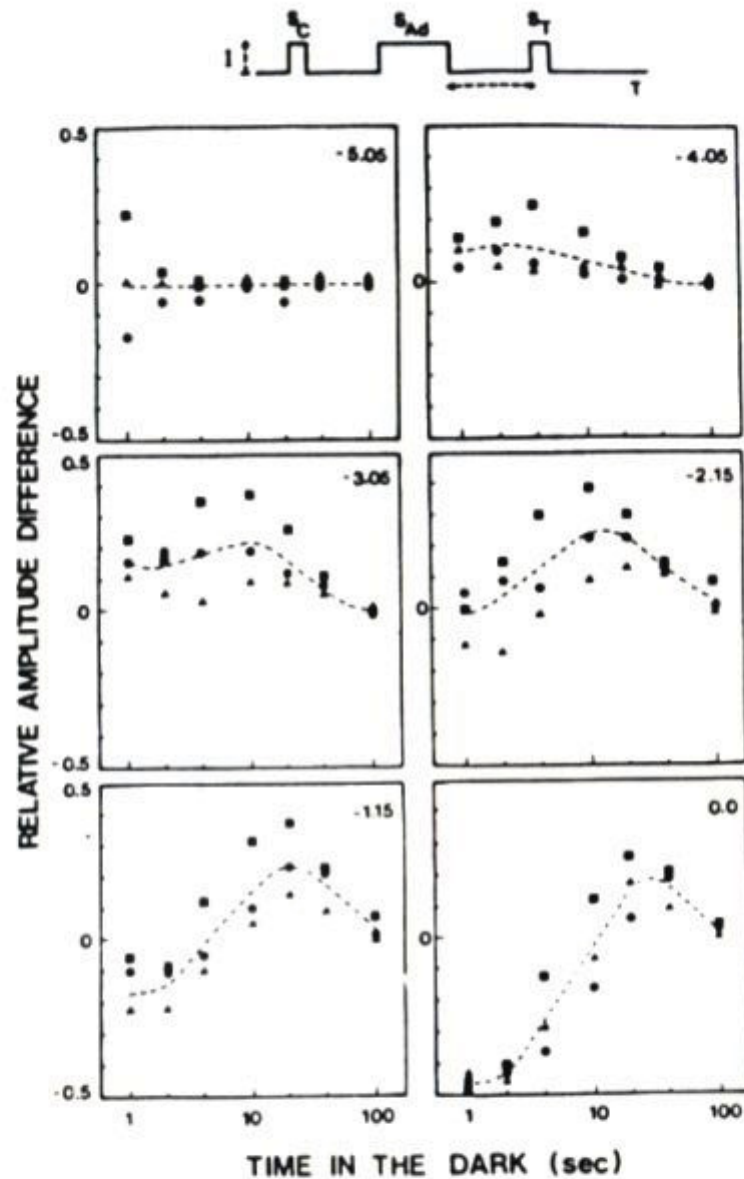


FIGURA 7 - Diferença relativa de amplitude entre ERGs obtidos nos estados adaptados à luz e ao escuro em função do intervalo escuro entre o fim do S_{Ad} e a apresentação de S_T , para cada nível de intensidade. A duração de S_{Ad} era sempre de 5s. A atenuação da intensidade luminosa está indicada em cada gráfico. O diagrama superior mostra a sequência de estimulação. (Ventura e Puglia, 1977).

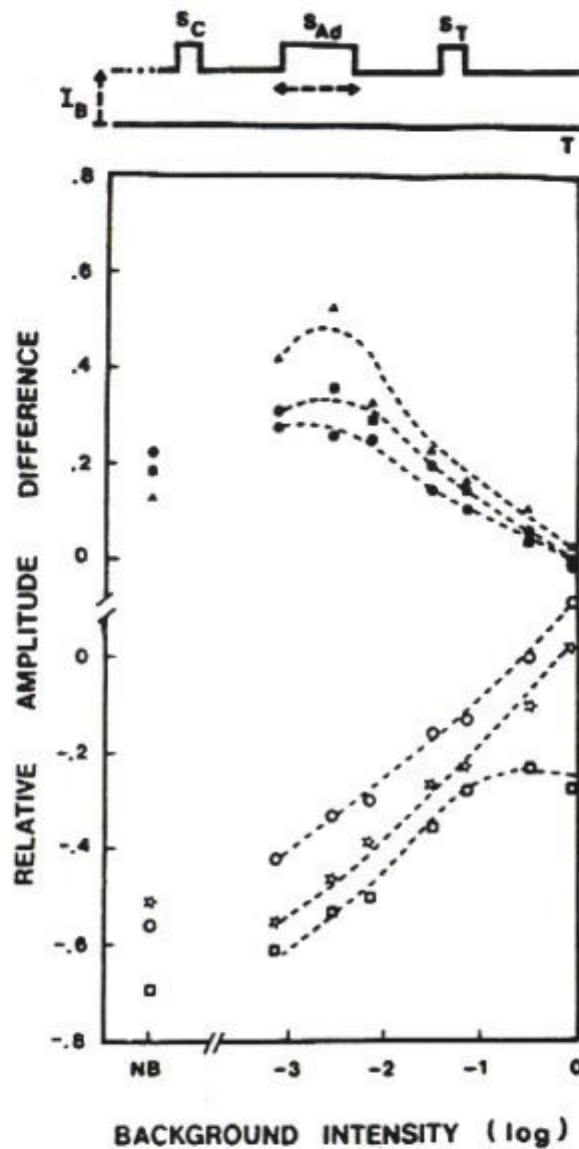


FIGURA 8 - Diferença de amplitude relativa entre ERGs obtidos nos estados adaptado à luz e ao escuro em função da intensidade do fundo luminoso ($\log IB=0$ equivale a 1.5 log abaixo de $\log I=0$). Gráfico de cima é para durações de adaptação mais curtas ($S_{Ad} = 0.1s$). Gráfico de baixo é para durações de adaptação longas ($S_{Ad} = 10s$, indicado com círculos vazios e $S_{Ad} = 50s$ indicado com quadrados vazios e estrelas). Cada função provém de uma preparação diferente. NB na abscissa refere-se a ausência de iluminação de fundo. O diagrama superior mostra a sequência de estimulação. (Ventura e Puglia, 1977).

2.5. RELAÇÃO ENTRE AMPLITUDE E LATÊNCIA

Medidas das latências nos experimentos anteriores revelaram que elas não acompanham as mudanças de amplitude observadas. Latências de respostas facilitadas eram relativamente constantes, apesar dos aumentos e diminuições de facilitação. As latências de respostas adaptadas eram geralmente mais longas que as para S_c . Estes resultados não correspondem às previsões do modelo de Fuortes e Hodgkin (1964), nem aos resultados de mudanças de latência obtidos por Dudek e Koopowitz (1973) no olho composto do inseto *Oncopeltus fasciatus*.

2.6. COMPARAÇÃO ENTRE ESPÉCIES NOTURNAS E DIURNAS

Formigas de diferentes hábitos de vida, cujas características de sensibilidade visual e de resolução temporal haviam sido medidas através do ERG em nosso laboratório (Bergamasco, 1980; Tiedemann, 1980) foram comparadas com relação a adaptação e facilitação. A resolução temporal medida em várias situações é baixa em *A. sexdens*, uma formiga de hábitos noturnos, que vive sob o solo a maior parte do tempo, é maior em *Camponotus crassus*, que vive em ninhos nos troncos de árvores e é mais encontrada forrageando durante o dia, e ainda maior em *Pseudomyrmex adustus* e *P. phyllophilus*, que também nidificam em árvores, são diurnas e muito visuais. Nesta última a resolução temporal é superior à de abelhas (Souza, 1986; Souza e Ventura, 1989), mostrando que a habilidade de voar não determina necessariamente as resoluções mais altas possíveis. ERGs de *Pseudomyrmex adustus* e *Camponotus crassus* foram registrados em função de duração da luz de adaptação S_{Ad} e do intervalo no escuro entre o fim de S_{Ad} e a apresentação do pulso de teste S_t . Os resultados foram comparados aos de *Atta sexdens*.

Esses experimentos mostraram, em primeiro lugar, que ocorre facilitação nas três espécies. Mostraram também que os parâmetros relativos a este fenômeno diferem entre estas espécies. Facilitação ocorre na duração de S_{Ad} mais curta em em todas três espécies. À medida que aumenta a duração de S_{Ad} a magnitude de facilitação diminui e a resposta a S_t passa a ser menor que a S_c (adaptação). A duração em que essa transição ocorre é mais longa para as espécies de visão mais rápida. O curso temporal da facilitação também difere entre as espécies: embora o tempo total de permanência do efeito seja o mesmo (2 min), o máximo ocorre em 20 s para *A. sexdens*, entre 4 e 10 s para *C. crassus* e em 2 s para *P. adustus*.

2.7. FACILITAÇÃO E ADAPTAÇÃO: UM OU DOIS PROCESSOS?

Os mecanismos da facilitação devida à adaptação à luz encontrada nos experimentos que descrevemos acima são ainda obscuros. As evidências existentes permitem apenas excluir algumas possibilidades. Assim, nossos experimentos, e os de outros autores que

também utilizaram o ERG (Ruck e Jahn, 1954; Dudek e Koopowitz, 1973; Dudek, 1975; Giulio e Lucaroni, 1967) afastam a possibilidade sugerida por Hanani e Hillman (1976) de que se trate de um fenômeno de injúria, pois, como foi também observado por DeVoe (1972), está presente tanto intracelularmente como no ERG de animais intactos. Além disso, os experimentos de Giulio e Lucaroni (1967) examinaram a possibilidade de que facilitação seja causada por influências não retinianas, removendo os gânglios ópticos ou administrando nicotina. Essas manipulações não afetaram a resposta facilitada. Não fica contudo excluída a possibilidade de participação de elementos não retiniais pois a remoção dos gânglios ópticos é uma operação delicada e nunca se pode afirmar que seja completa e nicotina é apenas uma das muitas substâncias que poderiam ser testadas.

A contribuição que os resultados com ERG acrescenta a este quadro é a demonstração, embora indireta, de que a facilitação deve ser considerada um processo separado do que causa adaptação ou redução da resposta. Esta sugestão baseia-se nas seguintes observações sobre facilitação feitas em nossos dados:

a) é vista como uma elevação de apenas um dos componentes do ERG, enquanto os outros são reduzidos; na adaptação todos os componentes sofrem redução;

b) funções separadas para facilitação e adaptação são obtidas através de manipulações apropriadas dos estímulos, como visto na Figura 6;

c) seu curso temporal é relativamente fixo, enquanto o da adaptação não é, como pode ser visto na Figura 8 ;

d) níveis baixos de iluminação de fundo afetam a facilitação e a adaptação de formas diferentes, conforme mencionado acima na descrição dos resultados da Figura 8;

e) mudanças de amplitude são relativamente independentes das mudanças de latência para a resposta facilitada. Este resultado contrasta com a dependência entre amplitude e latência relatada por outros autores (e. g. Fuortes e Hodgkin, 1964) quando só adaptação (e não facilitação) foi encontrada como resultado da exposição à luz.

Com base nestas observações pode-se supor que a facilitação deva ser causada por um mecanismo independente do que causa redução do ERG. Os ERGs adaptados à luz obtidos com esta preparação seriam, portanto, resultantes de tendências opostas a aumentar e a diminuir com relação à resposta adaptada ao escuro. O resultado final, refletindo preponderância de uma das tendências, ou seu equilíbrio, dependeria dos valores específicos de duração e intensidade de exposição à luz, intervalo no escuro, e iluminação de fundo.

Ainda não se podia saber por estes experimentos se o mecanismo responsável pela facilitação observada no ERG está localizado na célula fotorreceptora ou depende de interações retinianas laterais. O fenômeno poderia ser causado por uma das duas possibilidades, ou por uma combinação delas.

3. ESTUDOS INTRACELULARES

A mensuração intracelular de facilitação em fotorreceptores restringia-se até o presente estudo aos registros no crustáceo *Balanus amphitrite* (Hanani e Hillman, 1976; 1982; Hanani, 1986), em nos aracnídeos *Limulus polyphemus* (Fein and Charlton, 1975), *Lycosa baltimoriana* (DeVoe, 1972) e *Menemerus confusus* (Yamashita e Tateda, 1976). Pelo menos no caso dos dados obtidos em *Balanus*, as características do fenômeno diferiam das registradas por nós em insetos, através do ERG, pelo fato de que facilitação em *Balanus* é associada com menor sensibilidade.

Os dados obtidos com ERG poderiam estar refletindo um fenômeno diferente do descrito no fotorreceptor. De fato, o ERG pode incluir também a resposta das camadas neurais seguintes – a lâmina ganglionar e a medula, especialmente a lâmina por ser mais próxima. Esta contém uma rede complexa de conexões destinadas ao processamento da informação dos fotorreceptores com vários tipos celulares e grande densidade de conexões sinápticas. A atividade elétrica das células monopolares da lâmina é bem descrita na mosca (Shaw, 1981) ou libélula (Laughlin, 1980), mas em himenópteros a dificuldade de registro impediu que o conhecimento progredisse muito. Existem os dados obtidos com muita dificuldade por Menzel em 1974, que relatam registros em 9 células monopolares e só muito recentemente um prosseguimento destas tentativas, agora com registro eletrofisiológico acoplado a marcação intracelular, com dados de 30 células monopolares na lâmina da abelha *Apis mellifera* (Souza *et al.*, 1987; Souza *et al.*, no prelo). Assim, a facilitação retiniana descrita até agora poderia ser apenas produto de uma característica do método usado: as respostas captadas refletiriam não a sensibilidade da retina mas a soma de potenciais de diferentes amplitudes, provenientes de duas camadas diversas: retina e lâmina.

Essa hipótese poderia ser aventada com base na proximidade entre retina e lâmina ganglionar e na grande dimensão desta camada na abelha e outros himenópteros. Foi contudo claramente descartada pelo exame da morfologia do cérebro da formiga *Atta sexdens*, a espécie na qual a maior parte dos dados foi colhida. Felisberti (1987) comparou a morfologia do cérebro e gânglios ópticos de *Atta sexdens*, *Camponotus crassus*, *Camponotus rufipes*, e *Pseudomyrmex phyllophilus*. Observa-se em seu estudo que é justamente na primeira espécie, na qual a magnitude de facilitação é a maior encontrada, que a distância entre retina e lâmina ganglionar é excepcionalmente grande. Nesta espécie, diversamente dos outros himenópteros que temos estudado existe uma longa separação entre as duas camadas: os axônios dos fotorreceptores percorrem uma distância de 800 μm até atingirem seus alvos sinápticos, as células monopolares grandes da lâmina. Nas outras espécies esta separação varia entre 50 e 150 μm . Dada a distância medida para *A. sexdens*, é impossível supor que haja captação de potenciais da lâmina por um eletrodo de massa na superfície da córnea, uma vez que estes potenciais teriam que se difundir passivamente por um meio não neural e ultrapassar uma barreira de alta

resistência, a membrana basal da retina, para atingirem o eletrodo. Por outro lado, se esta hipótese fosse verdadeira, esperar-se-ia que a magnitude de facilitação fosse maior em espécies em que a lâmina ganglionar é mais próxima da retina e tem maior dimensão. Isto não ocorreu: justamente nessas espécies a magnitude de facilitação foi menor (Ventura, 1983). Finalmente, nos registros obtidos em células monopolares da lâmina em abelhas os potenciais eram sempre de pequena amplitude, muito inferiores ao tamanho dos potenciais receptores (Souza *et al.*, 1987) de modo que sua contribuição para o ERG deve ser insignificante comparada à da retina.

Descartada a hipótese acima, confirma-se que a facilitação ocorre de fato no fotorreceptor. É ainda possível, contudo, supor diferentes formas para sua ocorrência. Pode ser consequência do funcionamento da cadeia de transdução ou do restabelecimento do potencial de repouso, ou pode ainda ser devido a uma retroalimentação provida da lâmina ganglionar (ver 3.3.1). Esta não deve ser confundida com a hipótese discutida acima, na qual se falava em captação direta de potenciais da lâmina. Aqui referimo-nos a modulação do fotorreceptor por influência de neurônios da camada seguinte, o que é totalmente diverso. Finalmente, poder-se-ia aventar a hipótese de acoplamento elétrico entre fotorreceptores.

Qualquer que seja a hipótese a ser examinada, como as características de facilitação observadas no ERG de insetos indicavam discrepâncias com relação aos dados obtidos em outros invertebrados, o primeiro passo era verificar a existência e características de facilitação no fotorreceptor de insetos. Os fotorreceptores em que foi demonstrada pertencem a sistemas visuais muito diferentes, mais simples que os de insetos: tanto o de *Balanus* como o olho ventral de *Limulus* caracterizam-se por serem ocelos (órgãos constituídos por um grupo de células fotorreceptoras numa depressão da superfície, sem aparelho dióptrico, cf. Shepherd, 1983) com células de dimensões muito grandes comparadas às de fotorreceptores de insetos. Demonstrou-se facilitação também em fotorreceptores dos olhos da aranha *Lycosa baltimoriana* (DeVoe, 1972), que são mais desenvolvidos que os ocelos acima mencionados, porém também de menor complexidade que os olhos compostos de insetos.

Nesta parte foram escolhidos insetos cujo tamanho de olho permite melhores condições de registro e são por isso comumente usados em trabalhos intracelulares de visão: o gafanhoto, de visão lenta e a abelha, de visão rápida (Souza, 1986; Souza e Ventura, no prelo).

Para obter os registros, o inseto era preso com o lado dorsal para baixo a um pequeno cilindro de latão de forma a imobilizar o tórax e a cabeça, deixando o abdômen livre. Um orifício aberto na extremidade superior do olho e imediatamente recoberto por vaselina permitia a introdução do eletrodo de registro em direção perpendicular ao eixo dos omatídeos, uma micropipeta de vidro preenchida com 2.5 M KCl, com resistências de ponta eram de 70 a 200 M Ohms, medidos na preparação. Detalhes do procedimento e do equipamento de registro podem ser encontrados em Souza e Ventura, (1989).

Tanto em abelhas como no gafanhoto foi possível registrar potenciais receptores com a técnica descrita acima, que vem sendo utilizada no laboratório há vários anos.

A Figura 9 apresenta exemplos de facilitação na abelha *Melipona quadrifasciata* e no gafanhoto *Schistocerca sp.* São comparados nos dois casos potenciais receptores colhidos após adaptação ao escuro (E) e após exposição à (L) luz, com a apresentação consecutiva de pulsos de luz de alta intensidade ($\log I = 0$, duração = 20ms). Os potenciais receptores obtidos após exposição a vários pulsos de luz mostram aumento da amplitude de pico nos dois casos: de 16% na célula retinular de abelha e de 42% na de gafanhoto. São aumentos muito grandes se for levado em conta o fato de que a intensidade usada é próxima da saturação. Nota-se também grande compressão temporal da resposta facilitada e a presença de pós potenciais despolarizantes (PDAs) em todas as respostas.

Estas respostas foram obtidas com estimulação proveniente de um diodo emissor de luz verde, cuja estreita faixa de emissão (570 nm; 1/2 largura de faixa 25 nm) permite garantir que os registros são de fotorreceptores com sensibilidade espectral máxima no verde. Estes são, em ambos os insetos os mais frequentemente impalados, possivelmente por serem os mais numerosos. No omatídeo da abelha existem oito células retinulares, das quais duas têm resposta máxima no ultravioleta, duas no azul e quatro no verde. Uma nona célula retinular é encontrada próximo à membrana basal e a julgar por sua morfologia deve ter resposta no ultravioleta. O omatídeo do gafanhoto possui estrutura análoga.

3.2.1 TRENS DE PULSOS

Nas Figuras 10 e 11 séries de 10 pulsos com diferentes intervalos entre si são apresentadas para ilustrar o curso temporal do fenômeno em fotorreceptores de abelha e de gafanhoto. Os estímulos usados correspondem à intensidade máxima possível no sistema, um pouco acima da intensidade saturante. Na situação de facilitação a amplitude continua contudo aumentando gradativamente até se estabilizar após alguns pulsos.

Os dados mostram que o fenômeno é mais evidente no gafanhoto que na abelha, e que no primeiro a evolução temporal da facilitação é mais lenta, ou seja, ainda há aumento de facilitação em intervalos de 5s enquanto em abelha o máximo é atingido com 2s de intervalo. Em ambos, facilitação continua presente mesmo com 10s de intervalo entre os pulsos.

É interessante comparar as respostas facilitadas às respostas do fotorreceptor para diferentes intensidades de luz (função $V/\log I$) colhidas com o olho adaptado ao escuro. A Figura 12 mostra do lado esquerdo uma função $V/\log I$, e do lado direito as amplitudes das respostas obtidos para um trem de pulsos na intensidade máxima.

Na curva da esquerda um dado importante é a amplitude de resposta máxima, chamada resposta de saturação (V_{sat}), a qual não aumenta com o aumento da intensidade. A relação entre amplitude de resposta (V) e intensidade da luz (I) é logarítmica passando a assintótica nos extremos inferior e superior de intensidade. O resultado é uma função sigmóide que corresponde à equação $I/I_{50} = [(V_M/V) - 1]^{1/s}$, onde I_{50} é a intensidade que elicia uma resposta de amplitude igual a $V_M/2$, V_M a da resposta de saturação e s é uma medida da inclinação da sigmóide (Naka e Rushton, 1961). A curva $V/\log I$ obtida para esta célula é típica das funções encontradas nesta espécie, cujo valor médio de s é de 0.75 (Souza, 1987).

Comparando-se as respostas facilitadas com V_{sat} (amplitude de resposta que não aumenta mais com o aumento da intensidade) medido com o olho adaptado ao escuro: há um aumento de 16%. As latências correspondentes aos potenciais receptores tanto da série de intensidades como dos trens de pulsos são também apresentadas.

O cálculo do ganho de sensibilidade nas respostas facilitadas é difícil por já se estar em V_{sat} . Pode-se contudo dizer que uma variação de amplitude de 16% corresponde a cerca de 1 log no trecho linear da sigmóide.

Outros parâmetros da resposta facilitada devem ser descritos para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos. Na adaptação à luz, segundo os dados e teorias mencionados anteriormente há sempre uma compressão temporal acompanhando a redução de resposta. Na resposta facilitada também vemos forte compressão temporal, mas esta acompanha o aumento de amplitude. A compressão temporal se evidencia em todos os parâmetros medidos: latência, tempo para atingir o pico, duração total, área. A partir da segunda resposta de uma série nota-se uma grande diferença de forma entre a resposta ao primeiro pulso de luz, muito lenta principalmente na taxa de descida, e as seguintes, sucessivamente mais rápidas (ver Figuras 10 e 11).

O aumento da amplitude do potencial receptor observado na facilitação parece dever-se à hiperpolarização da linha de base durante um certo período após o potencial receptor. O retorno ao potencial de repouso inicia-se com um potencial prolongado despolarizante (PDA, Hillman, 1979), seguido de um pós potencial hiperpolarizante. Este mantém-se por alguns segundos e é denominado pós potencial hiperpolarizante prolongado (PHP) (Hillman, 1979). Como o nível de despolarização atingido pelo pico do potencial receptor permanece aproximadamente constante a amplitude total do pico aumenta se a estimulação ocorrer dentro do período de duração do PHP. As Figuras 13 e 14 apresentam a relação entre facilitação e hiperpolarização, ambos em mV relativos à linha de base precedente à primeira estimulação, e à amplitude de pico obtida na primeira estimulação, para todas as células apresentadas neste trabalho. É clara a correlação entre facilitação e hiperpolarização.

Foram também medidas as latências das respostas facilitadas, observando-se que são sempre menores que as das respostas obtidas com o olho adaptado ao escuro. Isto pode ser visto no exemplo da Figura 12. Em algumas células a latência mantém-se menor

e constante, não havendo relação entre facilitação e latência para as respostas facilitadas. Em outras há um leve decréscimo em função do aumento da resposta: quanto maior a facilitação, menor a latência. Existem ainda uns poucos exemplos de aumento da latência com o aumento da resposta. Em conclusão, não parece haver relação entre latência e amplitude da resposta facilitada.

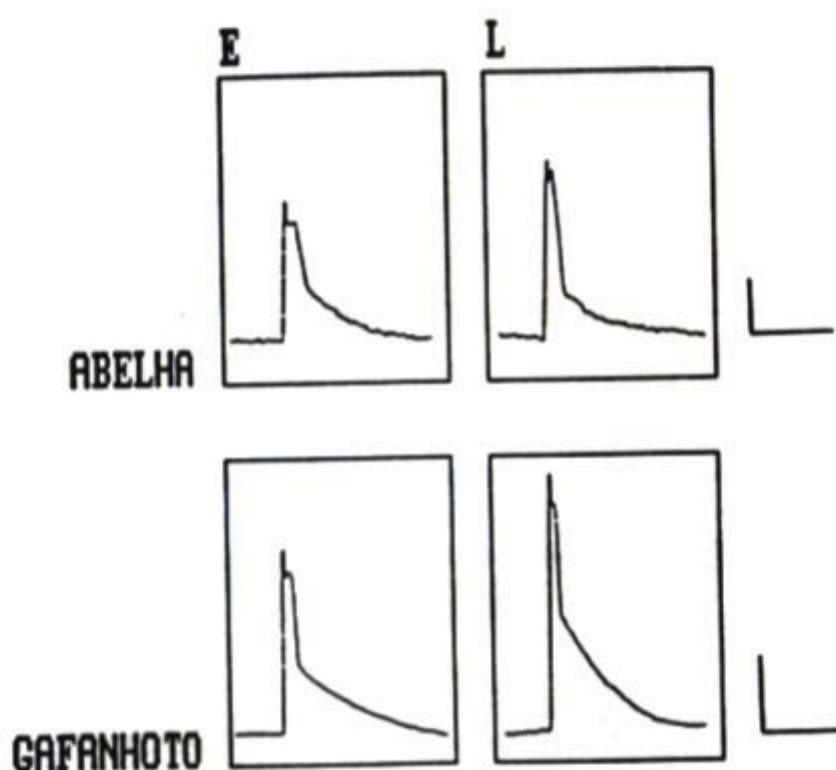


FIGURA 9 -Potenciais obtidos em fotorreceptores da abelha *Melipona quadrifasciata* (A) e gafanhoto *Schistocerca sp.* (G) com o olho adaptado ao escuro (lado esquerdo) e após exposição à luz com vários pulsos (lado direito). Duração dos pulsos: 20 ms. Intensidade: $\log I = 0$. Calibração: 1 s e 20 mV.

ABELHA

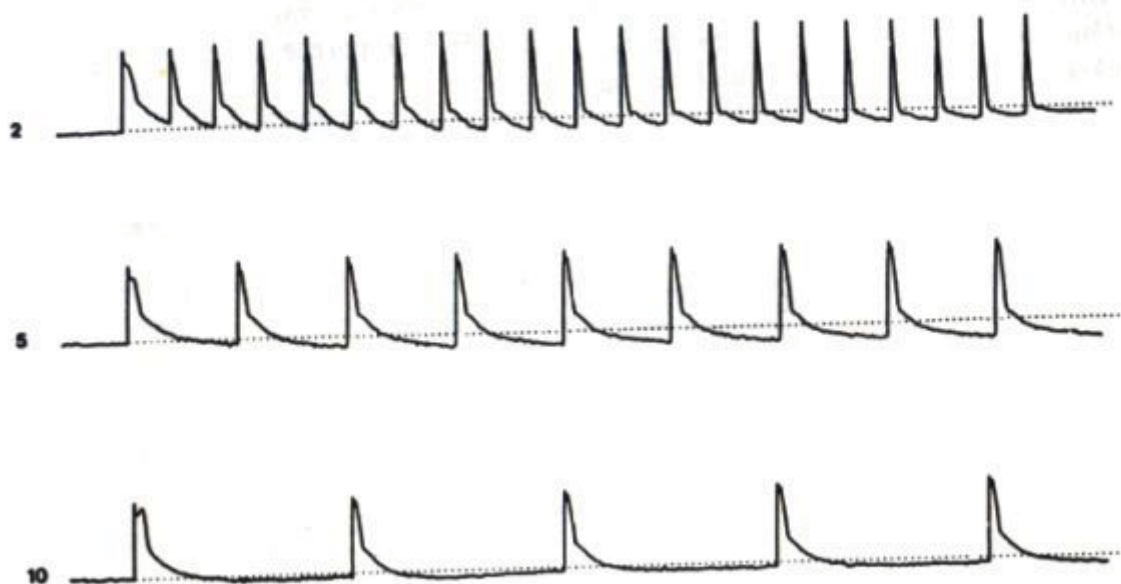


FIGURA 10 - Potenciais receptores obtidos em célula do olho composto da abelha *Melipona quadrifasciata* em resposta à apresentação de trens de 10 pulsos de luz com intervalos de 2, 5, e 10 s. Calibração: 1 s e 20 mV.

GAFANHOTO

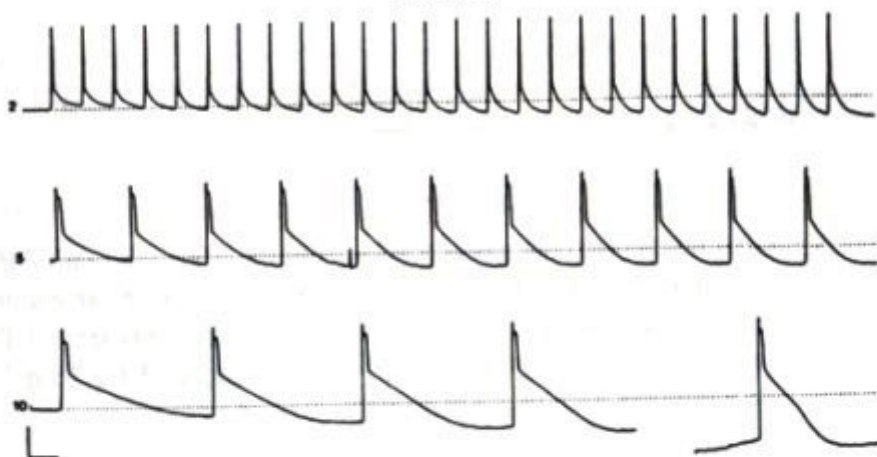


FIGURA 11 - Potenciais receptores obtidos em célula do olho composto do gafanhoto *Schistocerca sp.* em resposta à apresentação de trens de 10 pulsos de luz com intervalos de 2, 5, e 10 s. Calibração: 1 s e 20 mV.

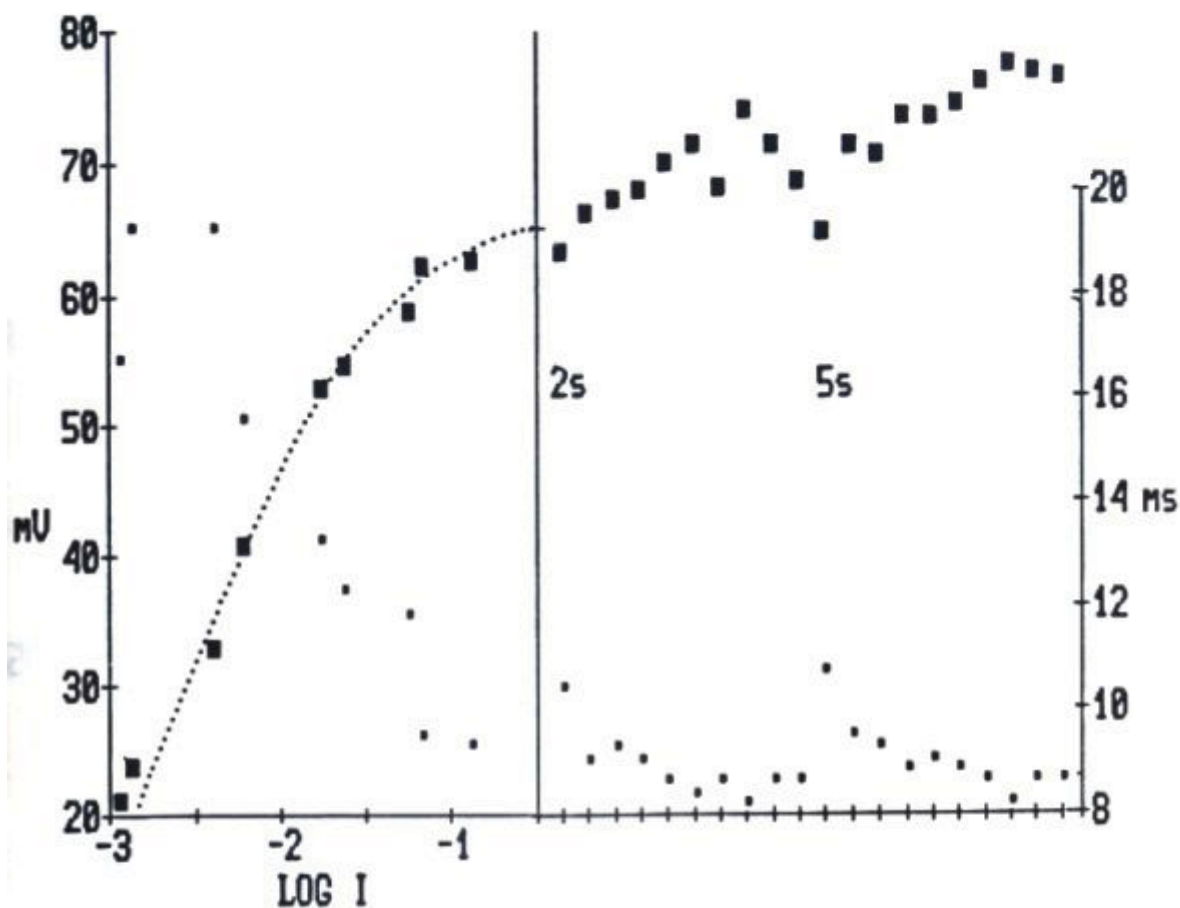


FIGURA 12 - *Lado esquerdo*: Amplitudes e latências de potenciais de pico do fotorreceptor F 50 da abelha *Melipona quadrifasciata* em resposta a pulsos de luz de 20 ms em diferentes intensidades para o olho adaptado ao escuro. *Lado direito*: Amplitudes de pico e latências da resposta da mesma célula a trens de pulsos com intervalos de 2s e 5s. Os quadrados grandes indicam amplitudes e os pequenos latências. A curva pontilhada é a parte superior de uma sigmóide ajustada aos dados desta célula com $s = .75$ e $V_{\text{sat}} = 66.4 \text{ mV.c}$

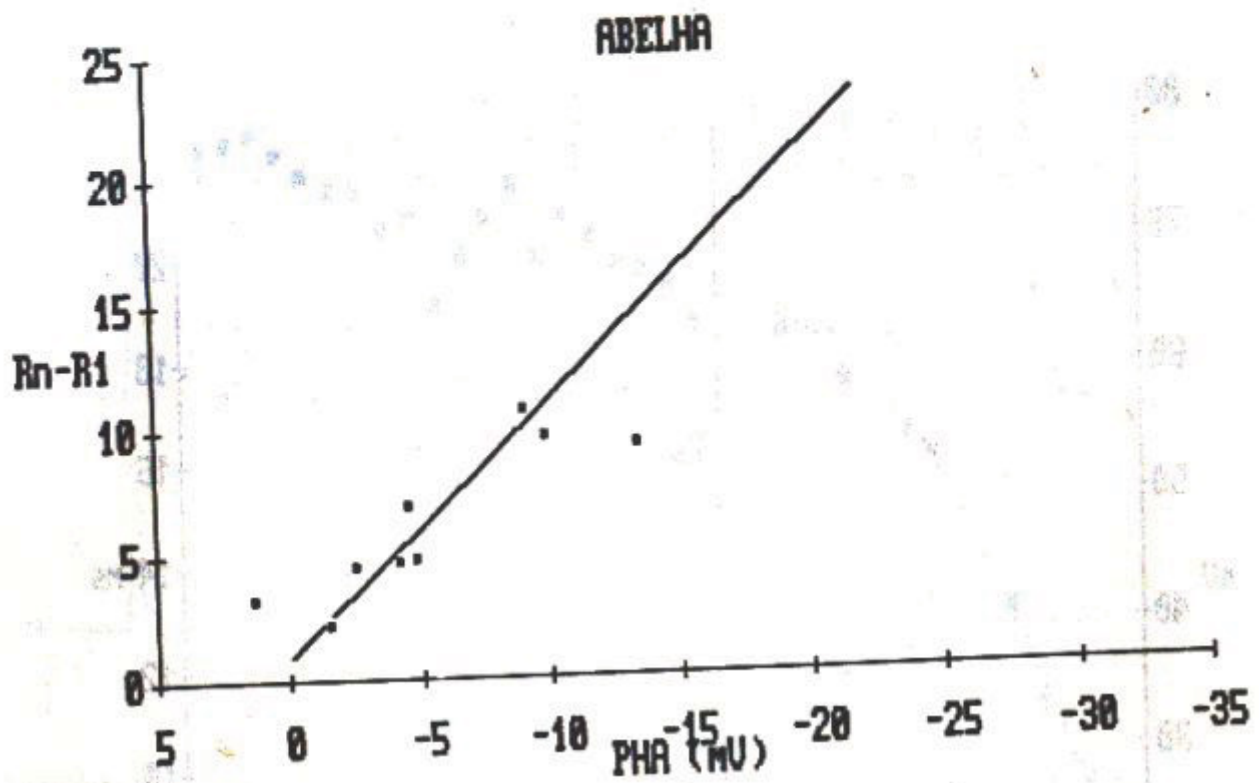


FIGURA 13 - Relação entre facilitação ($R_n - R_1$) e hiperpolarização (PHA) para várias células fotorreceptoras de abelha.

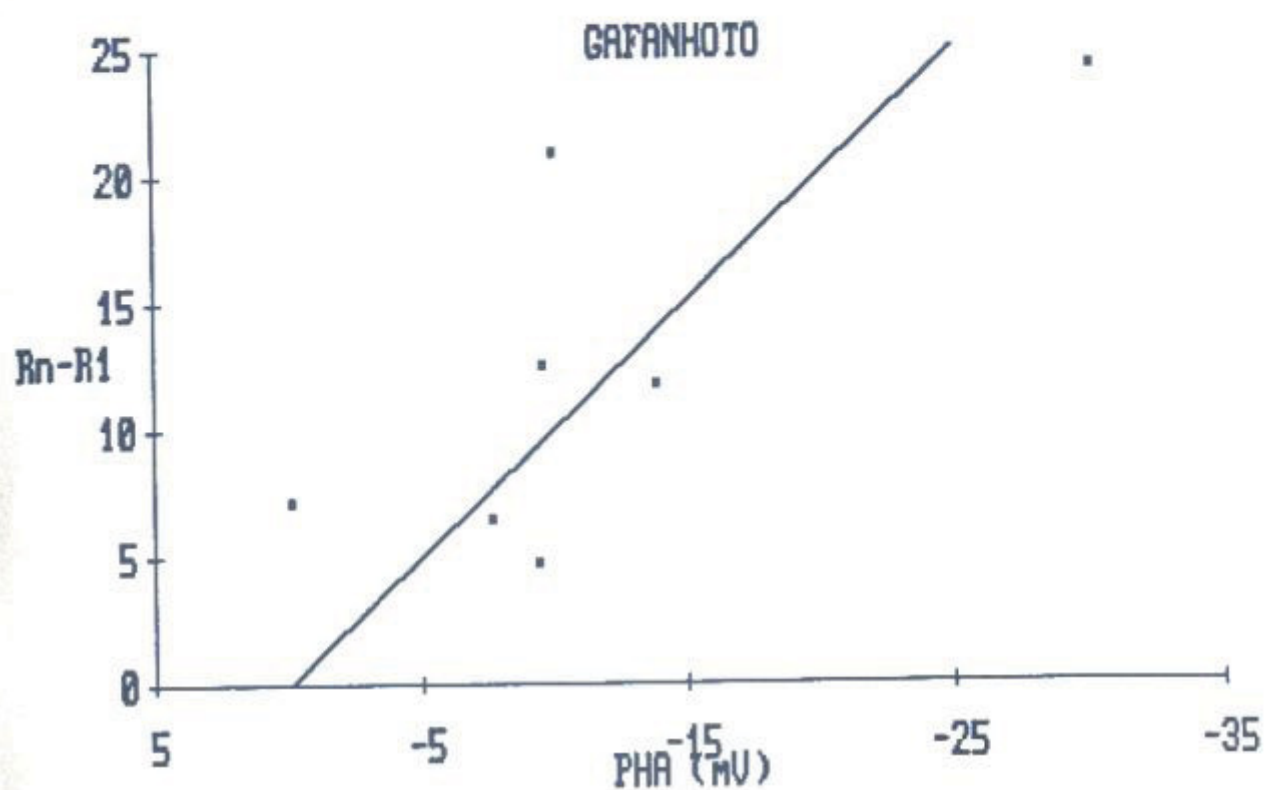


FIGURA 14 - Relação entre facilitação ($R_n - R_1$) e hiperpolarização (PHA) para várias células fotorreceptoras de gafanhoto.

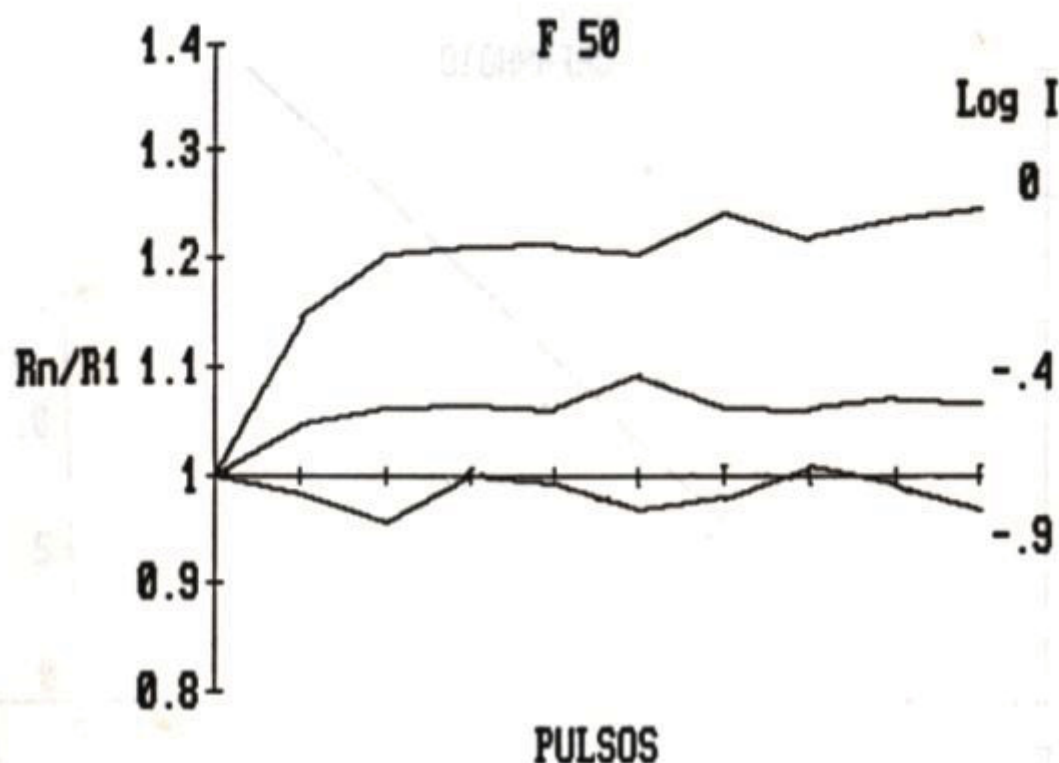


FIGURA 15 - Amplitudes relativas do potencial receptor de uma célula retinular de abelha para trens de pulsos de 2s de intervalo apresentados em diferentes intensidades do LED. A intensidade máxima é $\text{Log } I = 0$.

3.2.2 ADAPTAÇÃO À LUZ E AO ESCURO

A mesma sequência usada anteriormente nos experimentos com ERG foi aqui repetida em algumas células com a finalidade de se medir adaptação à luz e ao escuro. Foram apresentados, sempre na intensidade máxima, um pulso de luz controle seguido do estímulo de adaptação cuja duração variou de 50ms a 5s e por último um pulso de luz de teste. Os resultados obtidos nos fotorreceptores dos dois insetos foram semelhantes aos anteriores com ERG: facilitação é obtida com durações curtas de adaptação atingindo o pico em 50 ms e decrescendo com durações mais longas de exposição à luz. Acima de 1s de exposição à luz há diminuição da resposta ao pulso de luz de teste relativa ao de controle, ou seja, há adaptação ou redução de resposta. Também da mesma forma como ocorreu no ERG, a abelha, de visão rápida, mostrou menores variações de resposta tanto no sentido de facilitação como no de adaptação que o gafanhoto.

3.2.3 VARIAÇÃO DA INTENSIDADE

Os resultados obtidos com ERG mostraram que facilitação ocorre para pulsos de alta intensidade e curta duração. Na parte anterior demonstrou-se que no fotorreceptor são também as durações mais curtas que produzem os maiores valores de facilitação.

Para avaliar a dependência entre facilitação e intensidade da luz trens de pulsos de 20 ms de duração e 2s de intervalo foram apresentados em três diferentes níveis de intensidade. Facilitação aumentou com o aumento da intensidade, como pode ser visto na Figura 15 que mostra os resultados de uma célula. Os mesmos resultados foram obtidos em duas outras células.

3.3 INVESTIGAÇÃO DE ALGUMAS HIPÓTESES PARA EXPLICAR O MECANISMO DE FACILITAÇÃO

3.3.1 INFLUÊNCIAS SINÓPTICAS

A possibilidade de que facilitação fosse devida a influências neurais da rede lateral foi examinada. Esta possibilidade significaria a explicação do fenômeno através de uma modulação da resposta fotorreceptora por uma influência neural proveniente da camada seguinte - a lâmina ganglionar. Na eventualidade de existir uma retroalimentação deste tipo esta deveria manifestar-se por alteração da facilitação quando medida com a fonte luminosa fora do eixo omatidial, pois nessas condições as influências provenientes de circuitos vizinhos seriam alteradas. A amplitude da resposta a um pulso de luz diminui com o aumento da distância entre o ponto estimulado e o eixo omatidial, no qual é máxima.

Testamos essa possibilidade medindo a amplitude do potencial receptor da mesma forma que nos experimentos anteriores, mas apresentando a estimulação luminosa fora do eixo omatidial. Trens de pulsos apresentados para três das células que exibiram facilitação resultaram em respostas de menor amplitude com pouca ou nenhuma facilitação. Os resultados assemelharam-se aos obtidos com variação de intensidade (Figura 15) sugerindo que a diminuição da intensidade efetiva causada pelo afastamento do eixo omatidial deva ser a causa da variação das respostas.

Se a facilitação ou a adaptação dependessem da estimulação de omatídeos vizinhos àquele em que se registra e não do próprio, as respostas ao trem de pulsos seriam provavelmente diferentes das obtidas para um trem de pulso de menor intensidade apresentado no eixo omatidial, porque fora do eixo estaríamos estimulando mais intensamente interneurônios vizinhos inibidores ou facilitadores. Um teste mais adequado dessa hipótese teria sido apresentar a estimulação lateral em forma de anel em torno do eixo omatidial, aumentando portanto a intensidade efetiva em todos os

omatídeos equidistantes ao axial, e não apenas nos omatídeos de um dos lados, como foi feito. Ainda outra possibilidade seria comparar respostas a fontes de luz axiais, mas de diferentes áreas, cobrindo portanto um número maior ou menor de omatídeos vizinhos.

3.3.2 INFLUÊNCIA DA METARRODOPSINA

A metarrodopsina (M), um fotoproduto da rodopsina (R), é termoe estável nos invertebrados. Ao estimularmos um fotorreceptor para o verde o descoramento de R levará à produção de uma certa quantidade de M. Se for então apresentada ao olho luz correspondente ao espectro de absorção de M haverá fotorregeneração de R, com consequente aumento de sensibilidade do fotorreceptor (revs. em Hillman, *et al.*; Hamdorf, 1979). Relação entre facilitação e quantidade de metarrodopsina formada foi demonstrada no olho de craca (Hanani e Hillman, 1979).

Para testar esta possibilidade na abelha a facilitação obtida após estimulação com luz verde (filtro Schott VG9) foi comparada com facilitação obtida após 5s de estimulação com luz azul (filtro Schott BG12 + Kodak Wratten 96 1 log + vidro) em três células. Nenhuma diferença foi encontrada, como se pode observar nos dados da Figura 16 que mostram os resultados de uma das células. Nesta figura observa-se uma redução do potencial receptor após iluminação prolongada, seja com verde ou com azul, mas não há diferença entre as respostas às duas estimulações.

3.3.3 INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS DA CÉLULA

A hipótese de que facilitação pudesse ser um fenômeno relacionado com injúria ou morte da célula sob registro parece poder ser totalmente afastada tendo em vista que as células que apresentam facilitação são as que apresentam os maiores potenciais receptores, minipotenciais, nível alto de ruído de membrana, estabilidade do potencial de repouso e da amplitude do potencial receptor e outras características consideradas na literatura como indicativas de boas condições fisiológicas. Entretanto o fato de que na craca facilitação foi associada com menor sensibilidade do fotorreceptor e consequentemente com piores condições fisiológicas (Hanani e Hillman, 1976) levou-nos a testar diretamente essa possibilidade em uma preparação.

A Figura 17 apresenta os dados de uma célula em que trens de pulsos com intervalo de 2s foram apresentados repetidas vezes desde o impalamento até a morte da célula após 3 horas. Observa-se um aumento da facilitação do primeiro para o segundo trem, e a manutenção de um valor constante nos dois seguintes. Entre o quarto e quinto trens houve um intervalo de aproximadamente 2 horas. O potencial receptor diminuiu e a facilitação desapareceu, cedendo lugar à redução de potencial (último trem).

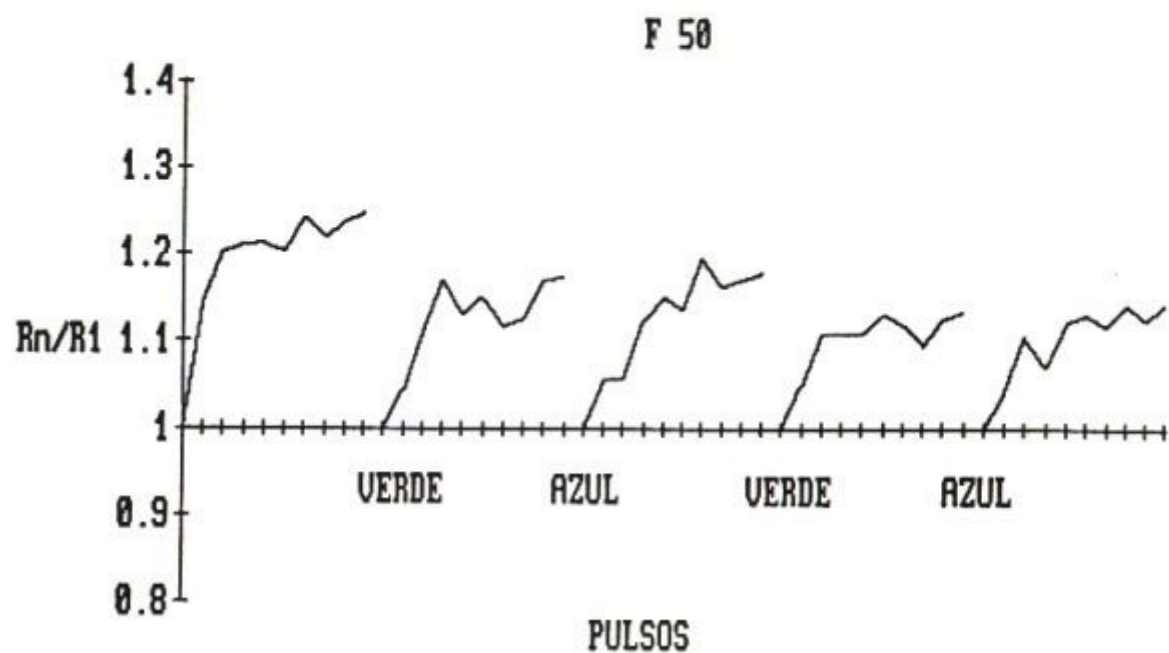


FIGURA 16 - Amplitudes relativas do potencial de pico em resposta a cinco trens de pulsos, quatro dos quais precedidos de adaptação cromática. Dados da célula F 50, fotorreceptor verde de abelha.

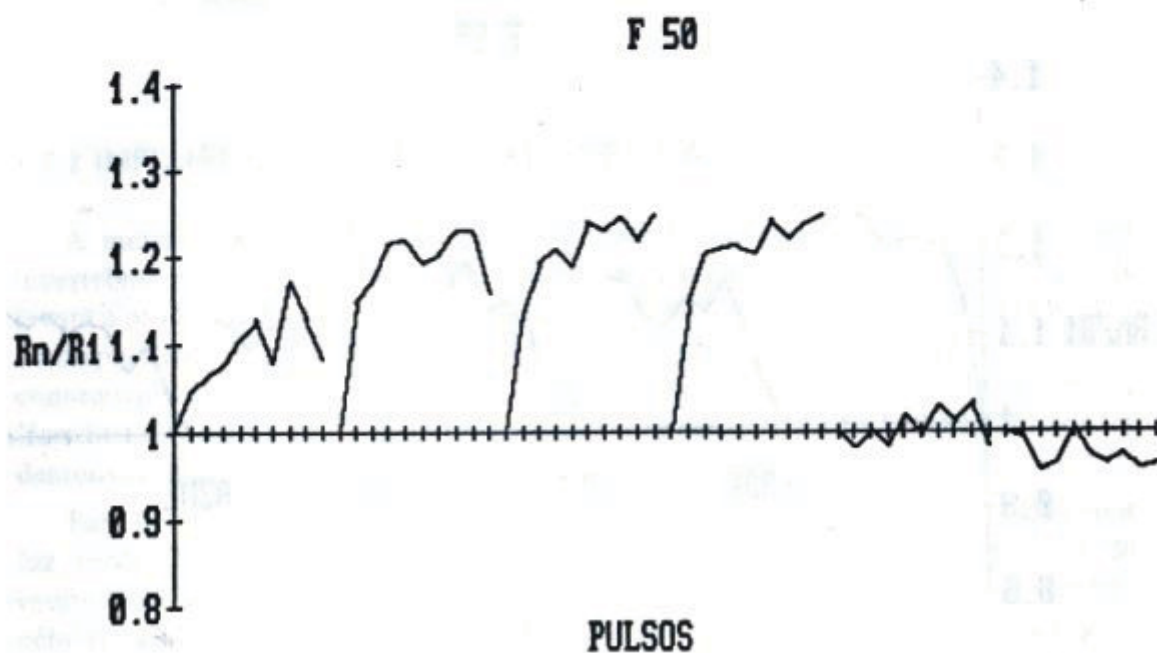


FIGURA 17 - Amplitudes relativas do potencial de pico em resposta a seis trens de pulsos, do início do impalamento à morte da célula. (A quarta sequência desta Figura foi seguida de quatro trens com pré-estimulação cromática.) Dados da célula F 50, fotorreceptor verde de abelha.

4. DISCUSSÃO

A confirmação da existência de facilitação no fotorreceptor de insetos obtida neste trabalho permite estender para o olho composto de insetos a generalidade deste fenômeno, já descrito em sistemas visuais mais simples.

Nossos dados anteriores obtidos com o ERG haviam conduzido à interpretação de que facilitação constitui um processo diferente do de adaptação (Ventura e Puglia, 1977; v. cap. 1). Esta conclusão baseou-se na observação de vários aspectos do fenômeno em que são encontradas diferenças em respostas adaptadas e facilitadas: apenas um dos componentes do ERG exibe aumento de amplitude na facilitação, os cursos temporais de adaptação à luz e ao escuro diferem para facilitação e redução de resposta, a sensibilidade aumenta com a intensidade do estímulo para respostas facilitadas (exposição curta à luz) e diminui para as adaptadas (exposição longa à luz); não há relação entre variação de amplitude e latência para respostas facilitadas.

Dentre essas diferenças entre os dois processos chamava a atenção especialmente a ausência de relação entre a amplitude e a latência das respostas facilitadas, por ser esta relação básica nos modelos que procuram explicar adaptação a luz (Fuortes e Hodgkin, 1964). Esta dependência é sempre encontrada no olho adaptado ao escuro: a latência diminui com o aumento da intensidade (Figura 12) e também com a adaptação à luz dentro de certos limites de intensidade e duração. A ausência de relação entre amplitude e latência nas respostas facilitadas do olho composto de himenópteros (Ventura e Puglia, 1977) foi comentada por Dahl (1978), que endossou nossa interpretação da inadequação do modelo de Fuortes e Hodgkin. Mais recentemente os mesmos achados foram confirmados por Hanani (1986) em registro intracelular no olho da craca. No caso deste autor a latência das respostas facilitadas era mais curta que a das adaptadas ao escuro, mas não se modificava acompanhando a amplitude das respostas.

Adiante serão descritos dados bioquímicos referentes à cascata de transdução que conduzem também à idéia de dois processos na resposta do fotorreceptor a luz: um de adaptação, e outro de excitação, mediados por substâncias diferentes. É interessante ressaltar neste ponto que mesmo com uma técnica simples como o ERG, a manipulação sistemática dos estímulos num estudo paramétrico detalhado permitiu antever a existência desses dois processos.

Hanani (1986) verificou também que a facilitação não resulta da redução do Ca^{2+} intracelular não sendo portanto um processo inverso ao de adaptação. Esta última é acompanhada de queda progressiva nas latências do potencial receptor, as quais variam proporcionalmente à variação de amplitude de pico do potencial receptor (Fuortes e Hodgkin, 1964). Na facilitação, como foi descrito por Hanani (1986) e neste trabalho, as latências das respostas são mais curtas que as das adaptadas ao escuro. Pela previsão do modelo do cálcio, se a facilitação fosse devida a um decréscimo do Ca^{2+} intracelular as latências deveriam aumentar junto com a amplitude. Mas o achado é inverso. As

latências e todos os outros parâmetros temporais das respostas facilitadas são mais curtos e permanecem aproximadamente constantes, ou apresentam pequeno decréscimo acompanhando o aumento de amplitude. Esta relação entre amplitude e latência é contrária, portanto, à prevista pelos modelos anteriores, tanto o do Ca^{2+} como o de Fuortes e Hodgkin.

É interessante observar que a relação direta entre amplitude e latência é característica do processo de adaptação: ambas diminuem. A relação inversa é característica do processo de excitação: a amplitude aumenta e a latência diminui. De fato, quando são apresentados ao olho estímulos de intensidades crescentes, aumenta a amplitude e diminui a latência. No caso das respostas facilitadas, a amplitude aumenta e a latência permanece estável ou continua diminuindo, muito embora a intensidade de estimulação seja sempre a mesma. Se, como tudo parece indicar, facilitação e adaptação são devidas a processos independentes, a conclusão a que se chega é que na hiperestimulação (estimulação repetitiva com intensidade luminosa muito alta) a excitação continua aumentando (potencial receptor aumenta) depois de a adaptação ter atingido um estado de equilíbrio (latências mantêm-se curtas).

Uma das diferenças importantes entre vertebrados e invertebrados na fotorrecepção é o fato de que nestes últimos a metarrodopsina (M), um dos fotoprodutos da rodopsina (R), é termoestável (Hamdorf, 1979). Assim como nos vertebrados, a iluminação do olho dentro da faixa espectral de M tem o efeito de fotorregenerá-la em R. Em iluminação prolongada as concentrações de ambas atingem um equilíbrio dependente da intensidade da luz e de sua distribuição espectral. Os efeitos da formação de M no PDA foram extensamente estudados em vários invertebrados (Hillman *et al.*, 1983). Hanani e Hillman (1979) demonstraram haver relação inversa entre a quantidade de M formada e a magnitude de facilitação no olho da craca, e aventaram a possibilidade de que a absorção de luz por R teria um efeito excitatório o qual seria antagonizado pela absorção de luz por M. Na suposição, por semelhança com outros casos, de que o fotopigmento do receptor verde deveria formar uma M na região do azul foram feitas por nós tentativas de examinar o possível papel de M na facilitação. Os resultados não mostraram qualquer diferença relacionada a estimulações com luz azul ou verde, que deveriam produzir diferentes quantidades de M. A ausência de efeito pode ser também devida a alguma diferença entre as duas espécies na sequência de transdução. Por outro lado, como não existe descrição de M para as rodopsinas existentes no olho da abelha (Hillman *et al.*, 1983 listam em sua revisão todos os casos estudados) talvez a estimulação usada por nós tenha sido inadequada. A possibilidade de uma relação deste tipo também nos insetos aqui estudados não deve portanto ser descartada, principalmente pelo fato de que tanto no caso de *Balanus* como nos nossos dados a facilitação é obtida com pulsos de intensidade saturante.

Os estudos recentes de transdução têm chegado por outra via, ou seja, pela análise bioquímica, à conclusão de que existem simultaneamente dois processos diferentes para

adaptação e excitação no fotorreceptor. Os dois processos são controlados por mecanismos diferentes: adaptação pelo Ca^{2+} intracelular (v. rev. em Autrum, 1981, Yau e Nakatani, 1985) e a excitação por um transmissor ou mensageiro sintetizado na cascata bioquímica da fototransdução (Fein et al., 1984; Brown et al., 1984). Uma das evidências para esta conclusão é a de que embora existam muitas provas de que o Ca^{2+} acompanha a adaptação (Brown e Blinks, 1974; Brown e Lisman, 1975, Stieve e Bruns, 1980, 1983), a injeção ionoforética de Ca^{2+} não provoca resposta excitatória no fotorreceptor (Brown e Lisman, 1975). Na realidade o papel do Ca^{2+} está sendo reinterpretado à luz da nova descrição da cadeia de reações de fototransdução (Matthews et al., 1985; Lamb, 1986; Pugh e Cobbs, 1986; Stryer, 1986), mas não parece haver dúvida sobre sua importância na adaptação ou dessensibilização provocada pela exposição à luz (Yau e Nakatani, 1985).

A sequência da cascata de transdução nos invertebrados (Fein, 1986; Fein et al., 1984; Brown et al., 1987; Devary et al., 1987), análoga à descrita para os vertebrados (Stryer, 1986), pode ser assim resumida: luz ativa a substância fotossensível, rodopsina, a qual passa ao estado fotoexcitado R^* . Nesse estado R^* facilita a ligação de guanosina trifosfato (GTP) com uma proteína G, a transducina, a qual passa ao estado ativado. Nesse estado a proteína G por sua vez ativa a enzima fosfolipase C, a qual gera trifosfato de inositol (InsP_3) a partir de fosfatidil inositol 4,5 difosfato. Este último atua como mensageiro interno ou segundo mensageiro causando direta ou indiretamente a abertura de canais de Na^+ na membrana e a consequente despolarização da célula fotorreceptora. Nos vertebrados sabe-se que a proteína G, ou transducina, inicia a cadeia que leva à hidrólise de GMPc , o mensageiro interno que mantém abertos os canais de membrana. O resultado da ação da luz, mediado pela transducina, leva à quebra de GMPc para $5'\text{GMP}$ pela fosfodiesterase reduzindo-se assim o número de moléculas de GMPc disponíveis para manter canais abertos. A consequência é o fechamento de canais, produzindo a hiperpolarização característica do potencial receptor de vertebrados (Lamb, 1986; Stryer, 1986).

Em invertebrados apenas um relato (no olho ventral de *Limulus*) mostra que o GMPc atua na fototransdução. Johnson et al. (1986) demonstraram uma ação excitatória do GMPc e um aumento de seus níveis como consequência da iluminação. Este último achado explicaria a diferença de sinal entre potenciais receptores de células visuais de invertebrados e vertebrados, dado que nestes últimos os níveis de GMPc diminuem com a iluminação. Entretanto a ação do GMPc parece ser restrita: atuando apenas sobre uma subpopulação de canais de membrana uma vez que seu nível de saturação é bem mais baixo que o da resposta à luz.

A maior parte dos trabalhos em invertebrados sugere que a enzima correspondente à proteína G e o transmissor secundário sejam diferentes dos de vertebrados. Estes trabalhos apontam para o InsP_3 como candidato a mensageiro. Fein et al. (1984) e Brown et al. (1984) aliando estudos eletrofisiológicos aos bioquímicos, demonstraram sua ação

excitatória e imitadora da ação da luz no fotorreceptor do olho ventral de *Limulus* por meio de injeção de pressão intracelular. No trabalho de Fein et al. (1984) facilitação na resposta à luz é obtida após injeção com InsP₃. Mais recentemente, Devary et al. (1987) também sugerem que a enzima no caso dos invertebrados seja a fosfolipase C e que o segundo mensageiro seja o InsP₃. Neste trabalho os autores mostram o efeito excitatório de InsP₃ em fotorreceptor de *Musca*. O composto foi introduzido no olho, no meio extracelular, e as respostas à luz obtidas em seguida eram de amplitude maior e apresentavam maior nível de ruído de membrana que as respostas controle. Infelizmente não há informação sobre as latências dessas respostas nem sobre a ocorrência ou não de hiperpolarização. A entrada do InsP₃ na célula deve ter ocorrido da forma descrita por Wilcox e Franceschini (1984) para várias moléculas hidrófilas as quais penetram o fotorreceptor quando este é iluminado. Devary et al. (1987) mostram também a potenciação do efeito excitatório quando se impede a hidrólise (inativação) de InsP₃ pela administração conjunta de 2,3 bisfosfoglicerato (DPG).

A comparação dos potenciais em resposta à luz obtidos após introdução de alta concentração de InsP₃ e de InsP₃ + DPG (difosfoglicerato) com as respostas facilitadas descritas no presente trabalho revela impressionante semelhança. Também os resultados de Minke e Stephenson (1985) que mostraram o aumento sucessivo de ruído despolarizante provocado pela introdução de quantidades crescentes de GTP (5'-b,y-imido) guanosina trifosfato dentro da célula ao serem apresentados pulsos de luz consecutivos fornecem uma explicação para o alto nível de ruído das células em que se encontra facilitação.

Estes achados sugerem que a interpretação dos dados encontrados neste trabalho possa ser a seguinte: facilitação consistiria em um aumento da amplitude de pico e do ruído de membrana em decorrência do acúmulo de InsP₃ no fotorreceptor. A quantidade de InsP₃ liberado e a facilitação aumentam com a intensidade da luz. Nas altas intensidades, nas quais se observa facilitação, a velocidade de inativação do InsP₃ poderia ser insuficiente para permitir o retorno ao nível de repouso. Em intervalos de tempo entre os pulsos em que adaptação não esteja atuando seria então possível observar o processo excitatório isoladamente. Nos nossos dados isto é possível acima de 2s para o fotorreceptor de abelha e de 5s para o de gafanhoto. No trem de pulsos de 2s de intervalo apresentado para fotorreceptor de gafanhoto há uma diminuição do potencial receptor para os primeiros pulsos, seguida de um aumento progressivo da resposta aos pulsos subsequentes. São então observados os dois processos: adaptação e facilitação. Em intervalos mais curtos as respostas evidenciam apenas o processo de adaptação, o qual mascara o de excitação ou facilitação. Em algumas células é possível mesmo com intervalos de 1s ver um decréscimo da resposta para os primeiros pulsos, seguido de um aumento e gradual estabilização. Nesta situação o processo adaptativo estaria contribuindo para a redução de resposta, mas o processo excitatório por saturação do mecanismo de inativação deixaria uma quantidade residual de InsP₃ livre que cresceria

de estimulação para estimulação. Assim, ao se estabilizar o efeito adaptativo seria possível observar o facilitatório. O fato desta mudança ocorrer deve ser tomado como evidência de que a adaptação atinge um estado estável antes da facilitação no fotorreceptor.

A excitação do fotorreceptor do invertebrado pela ação da luz, contrariamente à do vertebrado, é despolarizante e depende de um *aumento* da condutância de membrana para íons de Na^+ e K^+ . Além desta variação de condutância ocorre um aumento da condutância para K^+ que é independente da iluminação e é regulado pela quantidade de Ca^{2+} intracelular (Muijser, 1979). Esta corrente independente de luz (corrente de escuro), transportada pelos íons de K^+ é dependente do Ca^{2+} em algumas espécies e não em outras. (Muijser, 1979). Um aumento da condutância de membrana para íons de K^+ , possivelmente dependente de um influxo de Ca^{2+} foi relacionado por Hanani e Shaw (1977) em *Balanus* com o pós-potencial hiperpolarizante de fotorreceptores adaptados à luz. Os pós-potenciais hiperpolarizantes descritos em nossos dados poderiam também ser explicados por um aumento da condutância para o K^+ , que é causa de hiperpolarização em inúmeros sistemas. Mas não sabemos se são ou não dependentes de Ca^{2+} . Se forem, poderíamos estabelecer o elo entre o efeito excitatório do InsP_3 (em *Musca* e em *Limulus*) e os pós-potenciais hiperpolarizantes, pois vários trabalhos (Brown e Rubin, 1984, Payne et al., 1986 e Brown et al., 1987) demonstraram que a injeção intracelular de InsP_3 induz aumento do Ca^{2+} intracelular. Uma dificuldade com esta hipótese está em conciliá-la com os dados de Muijser (1979) que mostram que a *redução* do Ca^{2+} pela injeção de EGTA numa célula retinular de mosca (*Calliphora erythrocephala* M.) produz potenciais seguidos de hiperpolarização muito semelhantes à encontrada por nós no presente estudo, exibindo facilitação, que não é comentada pelo autor.

Outro aspecto importante a ressaltar nestes dados é o aspecto comparativo. Facilitação foi obtida nos dois insetos, mas as proporções de facilitação foram bem maiores no gafanhoto, que tem um olho mais lento. O curso temporal de facilitação foi também mais lento para o gafanhoto, ou seja, o máximo de facilitação foi atingido em intervalos maiores entre estímulos. Estes aspectos coincidem com o que já havia sido observado nos estudos comparativos que utilizaram o ERG descritos na primeira parte (Ventura, 1983). Uma diferença conspicua entre os fotorreceptores dos dois insetos, como entre fotorreceptores de outros insetos rápidos e lentos, é a diferença nas dimensões da célula fotorreceptora: comprimento, diâmetro, volume total, área rabdomérica. Dentro da hipótese acima, o fato de que a facilitação é menor nos fotorreceptores de menor volume poderia ser explicado pela existência de menor área de membrana e portanto menor capacidade de gerar o segundo mensageiro, cujo precursor é uma proteína de membrana: o fosfatidil inositol. Nestes fotorreceptores tanto o efeito facilitatório como o inibitório ou de adaptação são de menor magnitude. Há menor variação de amplitude decorrente destes estados que nos fotorreceptores de animais de visão lenta.

As outras hipóteses aventadas na Introdução, de que haja uma influência lateral na facilitação proveniente da lamina ganglionar, ou de que haja acoplamento elétrico entre os receptores não têm sustentação nos dados. A facilitação não aumenta, pelo contrário, diminui, se a luz estimulatória é desviada do eixo omatidial. Uma comparação quantitativa feita entre redução de intensidade luminosa com estimulação axial e deslocamento em torno do eixo mostrou que os dois procedimentos produzem funções indistinguíveis com relação a resolução temporal. Quanto ao acoplamento elétrico, muitas vezes postulado nos estudos de sensibilidade espectral (Menzel, 1979), foi totalmente descartado pelo menos nas inúmeras espécies de himenópteros com as quais temos trabalhado (Souza, 1986; Menzel et al., 1986; Hertel e Ventura, 1985) após o desenvolvimento do método de varredura espectral com resposta constante (Menzel et al., 1986). Como com este método são obtidas curvas de sensibilidade espectral semelhantes às de um pigmento descarta-se a possibilidade de ação conjunta de duas células. Não parece provável portanto que esta ação possa ocorrer no caso de facilitação. Acresce a isto que não há nenhuma evidência anatômica de acoplamento no caso de receptores de himenópteros.

REFERÊNCIAS

- Autrum, H. (1981). Light and dark adaptation in invertebrates. In Autrum H **Handbook of Sensory Physiology** VII/6C pp 1-92.
- Autrum, H. e von Zwehl, V. (1962). Sur spektralen Empfindlichkeit einzelner Sehzellen der Dohne (*Apis mellifica*). **Z. vegl. Physiol.** 46: 8-12.
- Azuma, M. e Azuma, K. (1979). The increase in sensitivity following light illumination in frog photoreceptors. **Vision Res.** 19:1171-1175.
- Barlow, H.B. (1964). Dark adaptation: a new hypothesis. **Vision Res.** 4: 47-58.
- Barlow, H.B. (1972). Dark and light adaptation: psychophysics. In Jameson D, Hurvich LM (eds) **Visual Psychophysics. Handbook of Sensory Physiology.** vol. VII/4, Springer, Berlin Heidelberg New York.
- Bartlett, N.R. (1965). Dark and light adaptation. In Graham CH. **Vision and Visual Perception**, Wiley, New York.
- Bergamasco, N.H.P. (1980). Inércia e sensibilidade no sistema visual de insetos (Hymenoptera: Formicidae). Tese de Doutorado. Instituto de Psicologia, USP.
- Bolsover, S.R. (1980). Sensitization in voltage clamped barnacle photoreceptors. **J. Physiol. (London)** 306: 65-78.
- Brown, J.E. e Blinks, J.R. (1974). Changes in intracellular free calcium concentration during illumination of invertebrate photoreceptors. Detection with aequorin. **J. gen. Physiol.** 64:643-665.
- Brown, J.E. e Lisman, J.E. (1975). Intracellular Ca modulates sensitivity and time scale in *Limulus* ventral photoreceptors. **Nature** 258: 252-254.
- Brown, J.E. e Rubin, L.J. (1984). A direct demonstration that inositol-trisphosphate induces an increase in intracellular calcium in *Limulus* photoreceptors. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 125: 1137-1142.
- Brown, J.E.; Rubin, L.J.; Ghalayini, A.J.; Traver, A.P.; Irvine, R.F.; Berridge, M.J. e Anderson, R.E. (1984). Myo-inositol polyphosphate may be a messenger for visual excitation in *Limulus* photoreceptors. **Nature** 313: 160-162.
- Brown, J.E.; Watkins, D.C. e Malbon, C.C. (1987). Light-induced changes in the content of inositol phosphates in squid (*Loligo pealei*) retina. **Biochem. J.** 247:293-297.
- Cobbs, W.H. e Pugh, Jr. E.N. (1985). Cyclic GMP can increase rod outer-segment light-sensitive current 10-fold without delay of excitation. **Nature** 313:585-587.
- Dahl, R.D. (1978). Facilitation in arthropod photoreceptors. **J. gen. Physiol.** 71: 221-222.
- Devary, O.; Heichal, O.; Blumenfeld, A.; Cassel, D.; Suss, E.; Barash, S.; Rubinstein, C.T.; Minke, B. e Selinger, Z. (1987). Coupling of photoexcited rhodopsin to inositol phospholipid hydrolysis in fly photoreceptors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 84: 6939-6943.

- Devoe, R.D. (1972). Dual sensitivities of cells in wolf spider eyes at ultraviolet and visible wavelengths of light. **J. gen. Physiol.** 59: 247-269.
- Dudek, F.E. (1975). The visual response from the compound eye of *Oncopeltus fasciatus*: effects of temperature and sensory adaptation. **J Insect Physiol** 21: 517-528.
- Dudek, F.E. e Koopowitz, H. (1973). Adaptation and temporal characteristics of the insect visual response. **J. comp. Physiol.** 82: 33-46.
- Enroth, C. (1952). The mechanism of flicker and fusion studied on single retinal elements in the dark adapted eye of the cat. **Acta Physiol Scand** 27: Suppl 100.
- Fein, A. (1986). Blockade of visual excitation and adaptation in *Limulus* photoreceptor by GDP-b-s. **Science** 232:1543-1545.
- Fein, A. e Charlton, J.S. (1975). Local adaptation in the ventral photoreceptors of *Limulus*. **J. gen. Physiol.** 66:823-836.
- Fein, A.; Payne, R.; Corson, D.W.; Berridge, M.J. e Irvine, R.F. (1984). Photoreceptor excitation and adaptation by inositol 1,4,5-trisphosphate. **Nature** 313: 157-160.
- Felisberti, F.M. (1988). Fotorreceptores extra-oculares e ritmo circadiano de mudanças morfológicas em omatídeos de formigas (Hymenoptera: Formicidae). Dissertação de Mestrado. Instituto de Psicologia da USP.
- Fuortes, M.G.F. e Hodgkin, A.L. (1964). Changes in time scale and sensitivity in the ommatidia of *Limulus*. **J. Physiol. (London)** 172: 239-263.
- Giulio, L. e Lucaroni, A. (1967). "Test flash" interaction in the electroretinographic response of the compound eye. **Experientia (Basel)** 23: 542-543.
- Granit, R. (1955). **Receptors and Sensory Perception**. Yale University Press, USA.
- Hamdorf, K. (1979). The physiology of invertebrate visual pigments. In Autrum H (ed). **Comparative Physiology and Evolution of Vision in Invertebrates. Invertebrate Photoreceptors. Handbook of Sensory Physiology. vol VII/6A** Springer: Berlim pp 145-224.
- Hanani, M. (1986). The relation between sensitivity changes and response time scale in the barnacle photoreceptor. **Vision. Res.** 26: 819-825.
- Hanani, M. e Hillman, P. (1976). Adaptation and facilitation in the barnacle photoreceptor. **J. gen. Physiol.** 67:235-249.
- Hanani, M. e Hillman, P. (1979). Absorption of light by metarhodopsin modifies the effect of a conditioning light on the barnacle photoreceptor. **Biophys. Struct. Mech.** 5: 231-235.
- Hanani, M. e Hillman, P. (1982). The contribution of pigment transitions to sensitivity changes in the barnacle photoreceptor and the correlation with prolonged depolarizing afterpotential. **Biophys. Struct. Mech.**, 8: 161-172.

- Hanani, H. e Shaw, C. (1977). A potassium contribution to the response of the barnacle photoreceptor. *J Physiol (London)* 270: 151-163.
- Hartline, P.H. e Lange, G.D. (1974). Optic nerve responses to visual stimuli in squid. *J. comp. Physiol.* 93:37-54.
- Hecht, S. Vision II. (1934). The nature of the photoreceptor process. In Murchison C (ed). **Handbook of General Experimental Psychology**, Clark University Press, Worcester, Mass.
- Hecht, S. (1937). Rods, cones and the chemical basis of vision. *Physiol. Review* 17: 239-290.
- Hertel, H. e Ventura, D.F. (1985). Spectral sensitivity of photoreceptors of the compound eyes of stingless tropical bees. *J. Insect. Physiol.* 31: 931-935.
- Hillman, P. (1979). Bistable and sensitizing pigments in vision. *Biophys. Struct. Mech.* 5: 111-112.
- Hillman, P.; Hochstein, S. e Minke, B. (1983). Transduction in photoreceptors: role of pigment bistability. *Physiol. Rev.* 63:668-772.
- Johnson, C.E.; Robinson, P.R. e Lisman, J.E. (1986). Cyclic GMP is involved in the excitation of invertebrate photoreceptors. *Nature* 324: 468-470.
- Lamb, T.D. (1986). Transduction in vertebrate photoreceptors: the roles of cyclic GMP and calcium. *Trends in Neurosciences* 9:224-228.
- Laughlin, S.B. (1980). Neural principles in the peripheral visual system of invertebrates. In Autrum H Comparative Physiology and Evolution of Vision in Invertebrates. **Handbook of Sensory Physiology**, VII/6B Springer: Berlin pp. 133-280.
- Lovisolo, D. e Busso, C. (1979). Sensitivity changes and facilitation in the photoreceptor of *Phalangium opilio* due to light adaptation. Preliminary notes. *Boll. Soc. It. Biol. Sper.* 55: 142-147.
- Lythgoe, R.J. e Tansley, K. (1929). The relation of the critical frequency of flicker to the adaptation of the eye *Proc Roy Soc (London) Ser B* 105: 60-92.
- Matthews, H.R.; Torre, V. e Lamb, T.D. (1985). Effects on the photoresponse of calcium buffers and cyclic GMP incorporated into the cytoplasm of retinal rods. *Nature* 313: 582-585.
- Menzel, R. (1974). Spectral sensitivity of monopolar cells in the bee lamina. *J. comp. Physiol.* 93:337-346.
- Menzel, R. (1979). Spectral sensitivity and colour vision in invertebrates. In: Autrum H (ed), Comparative Physiology and Evolution of Vision in Invertebrates. **Handbook of Sensory Physiology**, vol VII/6A, Springer: Berlin , pp 504-566.
- Menzel, R.; Ventura, D.F.; Hertel, H.; Souza, J.M. e Greggers, U. (1986). Spectral sensitivity of photoreceptors in insect compound eyes: a comparison of species and methods. *J. comp. Physiol.* 158: 165-177.

- Minke, B. e Stephenson, R.S. (1985). The characteristics of chemically induced noise in *Musca* photoreceptors. **J. comp. Physiol.** 156:339-356.
- Muijser, H. (1979). The receptor potential of reticular cells of the blowfly *Calliphora*: The role of sodium, potassium and calcium ions. **J. comp. Physiol.** 132: 87-95.
- Norman, R.A. e Werblin, F.S. (1974). Control of retinal sensitivity - I. Light and dark adaptation of vertebrate rods and cones. **J. gen. Physiol.** 63: 37-61.
- Naka, K.I. e Rushton, W.H.A. (1966). S-potentials from colour units in the retina of fish (Cyprinidae). **J. gen. Physiol.** 185: 536-555.
- Payne, R.; Corson, D.W.; Fein, A. e Berridge, M.J. (1986). Excitation and adaptation of *Limulus* ventral photoreceptors by inositol 1,4,5 trisphosphate result from a rise in intracellular calcium. **J. gen. Physiol.** 88: 127-142.
- Pugh, E.N. e Cobbs, W.H. (1986). Visual transduction in vertebrate rods and cones: a tale of two transmitters, calcium and cyclic GMP. **Vision. Res.** 26: 1613-1643.
- Puglia, N.M. (1975). Estudo eletrofisiológico de visão na formiga *Atta sexdens rubropilosa* (Forel, 1908). Tese de Mestrado. Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo.
- Puglia, N.M. (1980). Inércia e sensibilidade no sistema visual de insetos. Tese de Doutorado. Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo.
- Ruck, P. (1958). Dark adaptation of the ocellus in *Periplaneta americana*: a study of the electrical response to illumination. **J. Insect. Physiol.** 2:189-198.
- Ruck, P. e Jahn, T.L. (1954). Electrical studies on the compound eye of *Lygia occidentalis dana* (Crustacea, Isopoda). **J. gen. Physiol.** 37: 825-849.
- Rushton, W.A.H. (1961a). Dark adaptation and the regeneration of rhodopsin. **J. Physiol. (London)** 156:166-178.
- Rushton, W.A.H. (1961b). Rhodopsin measurement and dark adaptation in a subject deficient in cone vision. **J. Physiol. (London)** 156: 193-205.
- Rushton, W.A.H. (1965). The Ferrier Lecture: Visual adaptation. **Proc. Roy. Soc. (London)** Ser B 162: 20-46.
- Rushton, W.A.H. e Westheimer, G. (1962). The effect upon the rod threshold of bleaching neighbouring rods. **J. Physiol. (London)** 164: 318-329.
- Shaw, S.R. (1972). Decremental conduction of the visual signal in barnacle lateral eye. **J. Physiol. (London)** 220: 145-170.
- Shaw, S.R. (1981). Anatomy and physiology of identified non-spiking cells in the photoreceptor-lamina complex of the compound eye of insects, especially Diptera. In **Neurones without Impulses**, (eds Roberts A, Bush BMH) pp 61-116. Cambridge University Press: Cambridge.
- Shaw, C.; Hanani, M. e Hillman, P. (1979). The effects of Mn^{2+} and Ca^{2+} on the prolonged after potential in barnacle photoreceptor. **Biophys. Struct. Mech.** 5:223-230

- Shepherd, G. (1983). **Neurobiology** Oxford University Press: Oxford.
- Souza, J.M. (1986). Somação temporal em fotorreceptores de insetos. Dissertação de Mestrado, Instituto de Psicologia - USP, 134 pp.
- Souza, J.M.; Hertel, H.; Menzel, R. e Ventura, D.F. (1987). Marking and recording of monopolar cells in the bee lamina. **Brazilian J. Med. Biol. Res.** 20: 851-855.
- Souza, J.M. e Ventura, D.F. (1987). Temporal summation and critical duration in bee photoreceptors: A comparison of measurement methods. **Brazilian. J. Med. Biol. Res.** 20: 649-652.
- Souza, J.M. e Ventura, D.F. A comparative study of temporal summation and response form in hymenopteran photoreceptors. **J. comp. Physiol.** (no prelo).
- Srebro, R. e Behbehani, M. (1974). Light adaptation in the ventral photoreceptor of *Limulus*. **J. gen. Physiol.** 64: 166-185.
- Stieve, H. e Bruns, M. (1980). Dependence of bump rate and bump size in *Limulus* ventral nerve photoreceptor on light adaptation and calcium concentration. **Biophys. Struct. Mech.** 6:271-285.
- Stieve, H. e Bruns, M. (1983). Bump latency distribution and bump adaptation of *Limulus* ventral nerve photoreceptor in varied extracellular calcium concentration. **Biophys. Struct. Mech.** 9: 329-339.
- Stratton, W.P. e Ogden, T.E. (1971). Spectral sensitivity of the barnacle, *Balanus amphitrite*. **J. gen. Physiol.** 57: 435-447.
- Stryer, L. (1980). Cyclic GMP cascade of vision. **Annu. Rev. Neurosci.** 9:87-116.
- Tiedemann, K.B. (1980). Processamento temporal no sistema visual de artrópodes. Tese de Doutorado. Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo.
- Ventura, D.F. (1968). The effect of adaptation level on critical flicker frequency. Ph D Dissertation, Columbia University, New York.
- Ventura, D.F. (1983). Retinal sensitivity facilitation in the insect eye **Internat. J. Psychophysiology** 1: 122-123.
- Ventura, D.F.; Marinoya, C.; Bloch, S. e Puglia, N.M. (1976). Visual sensitivity and the state of adaptation in the ant *Atta sexdens*. **J. com. Physiol.** 110: 333-342.
- Ventura, D.F. e Puglia, N.M. (1977). Sensitivity facilitation in the insect eye. A parametric study of light adapting conditions. **J. comp. Physiol.** 114: 35-49.
- Wilcox, M. e Franceschini, N. (1984). Illumination induces dye incorporation in photoreceptor cells. **Science** 225: 851-854.
- Yau, K-W e Nakatani, K. (1985). Light-induced reduction of cytoplasmic free calcium in retinal rod outer segment. **Nature** 313:579-582.
- Yamashita, S. e Tateda, H. (1976). Hypersensitivity in the anterior median eyes of a jumping spider. **J. exp. Biol.** 65:507-516.