**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE PSICOLOGIA**

MIRELLA TELLES SALGUEIRO BARBONI

**Avaliação eletrofisiológica e psicofísica das vias visuais ON e OFF
em jovens com distrofia muscular de Duchenne
(versão corrigida)**

São Paulo

2012

MIRELLA TELLES SALGUEIRO BARBONI

**Avaliação eletrofisiológica e psicofísica das vias visuais ON e OFF
em jovens com distrofia muscular de Duchenne**

(versão corrigida)

**Tese apresentada ao Instituto de
Psicologia da Universidade de São
Paulo, como parte dos requisitos
para obtenção do grau de Doutor em
Neurociências e Comportamento.**

**Área de Concentração:
Neurociências e Comportamento**

**Orientadora: Prof^a. Dr^a. Dora Fix
Ventura**

Co-orientador: Prof. Dr. Jan Kremers

São Paulo

2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,
PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na publicação
Biblioteca Dante Moreira Leite
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo

Barboni, Mirella Telles Salgueiro.

Avaliação eletrofisiológica e psicofísica das vias visuais ON e OFF em jovens com distrofia muscular de Duchenne / Mirella Telles Salgueiro Barboni; orientadora Dora Selma Fix Ventura. -- São Paulo, 2012.

202 f.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Psicologia. Área de Concentração: Psicologia Neurociências e Comportamento) – Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

1. Retina 2. Vias visuais 3. Distrofia muscular de Duchenne 4. Distrofia 5. Olho (Fisiologia) 6. Psicofísica I. Título.

QP479

Nome: Barboni, M. T. S.

Título: Avaliação eletrofisiológica e psicofísica das vias visuais ON e OFF em jovens com distrofia muscular de Duchenne

Tese apresentada ao Instituto de Psicologia da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Neurociências e Comportamento

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

*Dedico este trabalho à minha mãe,
por sua decisão corajosa em me presentear com a vida.*

AGRADECIMENTOS

À Professora Dora Fix Ventura por sua dedicação ao Laboratório, por me receber de braços abertos, por confiar no meu trabalho e, principalmente, por me ensinar que para fazer ciência é preciso amar e trabalhar com persistência.

To Professor Jan Kremers, whose passion for visual sciences I admire greatly, for accepting me as his PhD student and for receiving me in his Lab in Erlangen where I had the chance to learn a lot and could share many nice moments with his scientific group.

Ao Professor Luiz Carlos de Lima Silveira por me receber diversas vezes em seu Laboratório, por sua admirável dedicação à ciência, pela enorme colaboração e por todas as conversas extremamente agradáveis e interessantes.

Ao Professor Marcelo Fernandes da Costa e à Professora Mirella Gualtieri pela grande amizade e confiança. Ao Professor Russell David Hamer e à Professora Christina Joselevitch pelas críticas e sugestões fundamentais para a interpretação dos resultados.

Aos Professores Givago da Silva Souza e Bruno Duarte Gomes pela fascinante dedicação à eletrofisiologia visual. Aos queridos amigos Labvis e UFPA com os quais compartilhei tantos momentos inesquecíveis.

Aos Professores Walter Yukihiro Takahashi e André Marcio Vieira Messias pelos exemplos de dedicação às ciências visuais e pelas frutíferas conversas nos Congressos.

À Doutora Ana Laura de Araújo Moura, ao Doutor Francisco Max Damico e à Mestre Sonia Maria Cipriani Fersura Moreira pelo carinho na avaliação de controles e pacientes.

Às Doutoradas Daniela Maria de Oliveira Bonci e Elaine Cristina Zachy pelas revisões dos textos, pelas discussões sobre genética e pelos resultados do Quociente de Inteligência dos pacientes.

À Doutora Claudia Feitosa-Santana pela amizade, pelo constante incentivo e pelos diversos trabalhos em conjunto que encontram-se documentados em forma de publicações.

Às Doutoradas Mayana Zatz e Rita de Cássia Pavanello e à equipe do Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo por fornecerem gentilmente os resultados dos exames de DNA dos pacientes.

À Associação Brasileira de Distrofia Muscular (ABDIM) e à Organização de Apoio aos Portadores de Distrofias (OAPD) pelo encaminhamento dos pacientes e pelo importante incentivo para a realização do estudo. Aos participantes da pesquisa que voluntariamente dedicaram um tempo para a realização dos exames visuais.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de doutorado e suportes financeiros. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelos suportes financeiros.

À minha amada família pelo grande apoio e carinho que sempre recebi. És Magyar családomnak. Ao Balázs Vince Nagy pela importantíssima colaboração nas diversas etapas do trabalho e por todo o amor dedicado. Szeretlek édes! À nova vida que cresce dentro de mim, fruto de um grande amor.

APOIO FINANCEIRO

Bolsa de Doutorado FAPESP # 07/55125-1
Projeto Temático FAPESP # 02/12733-8 e # 08/58731-2
Capes/Procad # 0019/01-1
CNPq # 523303/95-5
IBN-Net (FINEP) # 01.06.0842-00

“An experiment is a device to make Nature speak intelligibly. After that one has only to listen”.

George Wald

RESUMO

Barboni, M. T. S. (2012). *Avaliação eletrofisiológica e psicofísica das vias visuais ON e OFF em jovens com distrofia muscular de Duchenne*. Tese de Doutorado, Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A distrofina é uma das proteínas que formam o complexo glicoproteico necessário para a integridade da fibra muscular e sua disfunção causa uma doença genética letal para os seres humanos, a distrofia muscular de Duchenne (DMD). Além do papel fundamental no tecido muscular, a distrofina é necessária para a fisiologia da retina e, portanto, para o processamento da informação visual. Estudos anteriores mostraram prejuízo assimétrico no eletrorretinograma (ERG), maior para aumento da luminância (via “ON”) que para diminuição (via “OFF”). Além disso, prejuízos na visão de cores e contrastes eram mais frequentes e severos em pacientes com alterações genéticas que comprometem a expressão da isoforma Dp260. O objetivo do presente estudo foi verificar através de protocolos eletrofisiológicos e psicofísicos se existiam diferenças nas respostas mediadas pelas vias visuais “ON” e “OFF” em jovens com DMD e como estas se relacionavam com o genótipo. Foram avaliados 19 jovens com DMD (idade média = $15,2 \pm 3,4$ anos) cujos resultados foram comparados com os de sujeitos controles pareados por idade. Os métodos utilizados foram o ERG de campo total e medidas psicofísicas de sensibilidade ao contraste (SC) espacial e temporal de luminância. Protocolos tradicionalmente empregados foram associados a protocolos cujos estímulos visuais ativam, preferencialmente, a via “ON” ou a via “OFF”. Para o ERG de campo total foram utilizados seis protocolos: 1. ERG escotópico, 2. ERG fotópico, 3 e 4. ERGs mesópicos ON e OFF, 5 e 6. ERGs fotópicos ON e OFF. Para os quatro últimos foram utilizados estímulos intermitentes com modulação da luminância em dente de serra, com aumento rápido de luminância e diminuição gradual (“ON”) e o contrário (“OFF”). Para a avaliação psicofísica foi determinada: 1. SC para grades senoidais e SC temporal, e 2. SC a estímulos de tabuleiro de xadrez com aumento (“ON”) ou diminuição (“OFF”) da luminância média relativa ao fundo, apresentados com duração curta (sistema magnocelular) ou longa (sistema parvocelular). Os resultados mostraram redução da amplitude da onda-b dos ERGs escotópico e fotópico e prejuízos na SC espacial e temporal de luminância, concordando com a literatura. A contribuição inédita do presente estudo foi mostrar alteração nos ERGs “ON” e “OFF” para atividade dos bastonetes e no ERG “ON” para atividade exclusiva dos cones. Na avaliação psicofísica, houve redução da SC para os protocolos “ON” sem diferença entre magnocelular e parvocelular. Em conclusão, as alterações encontradas estão principalmente relacionadas com a atividade “ON” da retina. A alteração psicofísica da SC espacial de luminância de jovens com DMD deve estar relacionada, ao menos em parte, com prejuízos retinianos devidos à ausência da Dp260 ou da própria distrofina total (Dp427). Estudos futuros devem aprofundar a investigação utilizando protocolos do ERG que estimulam, preferencialmente, as vias magnocelular e parvocelular, e ampliar o número de pacientes avaliados para se obter as correlações entre as alterações genéticas e os prejuízos visuais.

Palavras-chave: sistema visual. retina. vias visuais. eletrorretinograma. sensibilidade ao contraste de luminância. distrofia muscular de Duchenne. distrofina.

ABSTRACT

Barboni, M. T. S. (2012). *Electrophysiological and psychophysical evaluation of ON and OFF visual pathways in Duchenne muscular dystrophy patients*. Tese de Doutorado, Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Dystrophin is one of the proteins that form the glycoprotein complex necessary for the muscular fiber integrity. Its dysfunction causes a genetic disease called the Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) which is lethal for humans. Besides its fundamental role in muscle tissues dystrophin is also necessary in the retinal visual information processing. Previous studies have demonstrated asymmetric deviations in the electroretinogram (ERG) of DMD with bigger changes to stimuli with increasing ("ON" pathway) than to decreasing ("OFF" pathway) luminance. Moreover, deficiencies in color vision and contrast sensitivity have been more frequent and severe in patients having genetic alterations related to the expression of the Dp260 isoform. The aim of the present study was to apply electrophysiological and psychophysical protocols to verify the suspected alterations in DMD patients regarding the "ON" and "OFF" visual pathways and relate the results to their genotypes. 19 DMD patients (mean age = 15.2 ± 3.4 years) were tested and their results compared to that of an age-matched control group. Full-field ERGs and spatial and temporal luminance contrast sensitivity tests were used during the examinations. Classical protocols were applied together with the ones preferentially stimulating "ON" or "OFF" visual pathways. The full-field ERG test consisted of six protocols: 1. Scotopic ERG, 2. Photopic ERG, 3. and 4. Mesopic ON and OFF ERGs, 5. and 6. Photopic ON and OFF ERGs. For the latter four protocols, flicker stimuli were used with sawtooth modulation of rapid increase and slower decrease in luminance ("ON") or rapid decrease and slower increase in luminance ("OFF"). The psychophysical evaluation comprised 1. Spatial contrast sensitivity test with sinusoidal gratings and temporal contrast sensitivity test, and 2. Contrast sensitivity tests with checkerboard stimuli with increasing ("ON") and decreasing ("OFF") luminance relative to the background. The latter were presented for both short (magnocellular system) and long (parvocellular system) durations. In agreement with the literature, the results show reduced amplitudes in the scotopic and photopic b-waves and also impairment in the spatial and temporal contrast sensitivities. This study's novel contribution was the finding of alterations in both rod-driven "ON" and "OFF" ERGs and in the cone-driven "ON" ERG. The psychophysical analysis showed reduced contrast sensitivity with the "ON" protocol, which was for both magno- and parvocellular stimuli. In summary, the encountered alterations suggest damages in the "ON" pathway of the retina. The changes in spatial luminance contrast sensitivity of DMD patients are related, at least partially, to the lack of Dp260 or to the loss of the entire dystrophin (Dp427). Future studies shall investigate this in more details applying ERG protocols to stimulate magno- and parvocellular activities, and increase the number of patients to be able to determine correlations between visual dysfunctions and genetic mutations.

Keywords: visual system. retina. visual pathways. electroretinogram. luminance contrast sensitivity. Duchenne muscular dystrophy. dystrophin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Acima: representação da localização do gene da distrofina no cromossomo X (Xp21). Meio: linhas pretas verticais representam os 79 exons distribuídos em 2,5 milhões de bases; as setas indicam os sete promotores: os promotores B, M e P responsáveis pela transcrição da distrofina completa Dp427. O local de início da transcrição do promotor muscular é considerado a primeira base do gene e as transcrições das outras isoformas são iniciadas por promotores localizados em outras regiões do gene: promotores R (*retinal*), B₃ (*brain₃*), S (*Schwann cells*) e G (*general*) que são responsáveis pelas isoformas Dp260, Dp140, Dp116 e Dp71, respectivamente. Abaixo: representação das diferentes isoformas da proteína. Modificado de Muntoni et al. (2003).....36

Figura 2. Representação esquemática do complexo de proteínas associadas à distrofina. Doenças causadas por mutações nos genes que codificam as respectivas estruturas do complexo estão indicadas na figura (setas cinza). No subgrupo distroglicano, o componente β atravessa a membrana celular da fibra muscular, ligando o distroglicano α extracelular ao terminal C da distrofina no citoplasma. Alterações no componente α causam a distrofia muscular congênita (CMD). Outro subgrupo é formado pelas sintrofinas e distrobrevinas intracelulares. A sintrofina se liga à distrobrevina que, por sua vez, interage com o terminal C da distrofina. Mutações associadas aos sarcoglicanos do subcomplexo sarcoglicano-sarcospano causam distrofias musculares com diferentes níveis de severidade. Alterações na proteína distrofina são responsáveis pela DMD e BMD. Modificado de O'Brien & Kunkel (2001).....37

Figura 3. Representação esquemática da secção transversal do globo ocular destacando as principais estruturas (A) e representação esquemática simplificada dos principais grupos celulares da retina (B). Modificada de Kolb (2003).....45

Figura 4. Representação esquemática dos dois tipos de fotorreceptores presentes na na camada de fotorreceptores da retina humana: cone e bastonete. O segmento externo sensível à luz compreende uma área de membrana lipídica na qual as moléculas do fotorpigmento visual encontram-se armazenadas. O segmento interno compreende as organelas celulares convencionais. Na base da célula, localiza-se o terminal sináptico, responsável pela comunicação com os neurônios segunda ordem. O caminho de circulação da corrente elétrica está representado no bastonete. Modificado de Burns & Lamb (2003).....45

Figura 5. Comunicação entre o cone e as células bipolares ON e OFF. A luz inicia uma série de eventos intracelulares que resultam na hiperpolarização do fotorreceptor. A diminuição na liberação de neurotransmissor pelos fotorreceptores provoca diferentes respostas nas células bipolares: i) hiperpolarização das células bipolares OFF (à esquerda) e ii) despolarização das células bipolares ON (à direita). Modificado de Tessier-Lavigne (2000).....47

Figura 6. Representação do complexo sináptico do cone. O dendrito da célula bipolar ON forma o elemento central da tríade cujas posições laterais são ocupadas pelos processos da célula horizontal na sinapse invaginada. O dendrito da célula

bipolar OFF forma a sinapse basal. Os contatos ocorrem em três regiões especializadas nas quais as membranas celulares possuem maior densidade elétrica (linhas grossas). O pedículo do cone libera glutamato para os processos das células horizontais (h) e para os dendritos das células bipolares ON e OFF através da exocitose que ocorre no sítio de liberação localizado sob a fita sináptica. O contato sináptico entre o cone e a célula horizontal ocorre na parte invaginada logo abaixo da fita sináptica. A membrana da célula horizontal expressa receptores ionotrópicos de glutamato (iGluR). A membrana da célula bipolar OFF também expressa os receptores iGluR. A membrana da célula bipolar ON expressa o receptor metabotrópico de glutamato (mGluR6) e um canal não seletivo de cátions. Modificado de Vardi et al., 2002.....50

Figura 7. Representação da localização da distrofina e dos distroglicanos na invaginação do complexo sináptico do bastonete. B = dendrito da célula bipolar e H = processo da célula horizontal. Modificado de Schmitz & Drenckhahn (1997a, b).....53

Figura 8. Representação dos circuitos retinianos. Asteriscos = sinapse elétrica; setas = sinapse química; área sombreada = elementos da via do bastonete. Na via primária (A) os sinais dos bastonetes são enviados para as células bipolares ON de bastonetes (RB) e destas para as células amácrinas AII. As células amácrinas AII enviam os sinais através de junções elétricas para o terminal axônico da célula bipolar (CB) ON de cones, conservando o sinal, e para o terminal axônico da célula bipolar OFF dos cones, invertendo o sinal através de sinapses químicas. Finalmente, as células bipolares ON e OFF dos cones enviam os sinais dos bastonetes para as células ganglionares (GC) ON e OFF, respectivamente. Na via secundária (B), os sinais são enviados diretamente dos bastonetes para os cones através de junções elétricas e encaminhados para as células bipolares ON e OFF dos cones que, por sua vez, encaminham os sinais para as células ganglionares ON e OFF na retina interna. Na via terciária (C), os bastonetes fazem sinapses químicas (cujo sinal é conservado) diretamente com as células bipolares OFF dos cones que, por sua vez, transmitem os sinais para as células ganglionares OFF. A seta grande indica a sinapse química direta entre os bastonetes e a célula bipolar OFF. Modificada de Völgyi et al. (2004).....59

Figura 9. Exemplos de ERGs escotópico (adaptado ao esuro) e fotópico (adaptado ao claro) cujos parâmetros de estimulação são padronizados e periodicamente revisados pela ISCEV. As setas indicam o momento em que o estímulo luminoso ocorreu, neste caso um flash de luz. Modificada de Marmor et al. (2009).....61

Figura 10. Respostas do ERG escotópico (esquerda) e do ERG fotópico com flash de longa duração (direita) de controles e jovens com DMD. Observe que nesse estudo a duração do flash foi 80 ms. Jovens com DMD apresentam amplitude normal da onda-a e redução da amplitude da onda-b do ERG escotópico e do ERG fotópico com flash de longa duração. Fonte: Schmitz & Drenckhahn (1997a), a partir de Fitzgerald et al. (1994).....64

Figura 11. Ilustração de modulação temporal a 4 Hz da luminância do estímulo intermitente em dente de serra: rápido-ON (acima) e rápido-OFF (abaixo). Linhas pontilhadas: luminância média.....64

Figura 12. Foto do sistema *RETlport* (Roland Consult, Brandenburg, Alemanha) utilizado para a avaliação eletrofisiológica, mostrando monitor de vídeo, amplificadores e estimulador de campo total ou *Ganzfeld*.....77

Figura 13. Radiância espectral do conjunto de LEDs brancos. Medidas obtidas com espectralradiômetro modelo CS-1000 (Konica Minolta, Tokyo, Japan).....77

Figura 14. Foto apresentando o posicionamento dos eletrodos durante o ERG. O eletrodo terra foi colocado na fronte e o eletrodo referência na têmpora ipsilateral dos sujeitos, sobre pasta condutora (*Ten20*, Weaver and Company, Estados Unidos) aplicada no local após limpeza com gel abrasivo (*Nuprep*, Weaver and Company, Estados Unidos). O eletrodo de registro foi fixado no canto nasal e no canto temporal do olho examinado, através de fita adesiva, de forma a ficar posicionado na porção interna da pálpebra inferior.....79

Figura 15. Foto do sistema PSYCHO (Cambridge Research Systems, Reino Unido) utilizado para a avaliação psicofísica.....84

Figura 16. Representação dos estímulos utilizados para o teste do xadrez: contraste positivo = ON (A e C) e contraste negativo = OFF (B e D). As frequências espaciais foram 0,3 (Magno) ou 2 (Parvo) cpg e durações dos estímulos foram 33 (Magno) ou 1500 (Parvo) ms.....86

Figura 17. Representação dos estímulos utilizados para a avaliação da sensibilidade ao contraste espacial de luminância. Os estímulos foram apresentados de maneira estática, ou seja, sem modulação temporal. Durante o teste a apresentação foi aleatória para as quatro frequências espaciais avaliadas.....88

Figura 18. Representação dos estímulos utilizados para a avaliação da sensibilidade ao contraste temporal de luminância. Durante o teste a apresentação foi aleatória para as quatro frequências temporais avaliadas.....88

Figura 19. ERGs de campo total de um sujeito do grupo controle obtidos em resposta às diferentes condições de estimulação luminosa indicando os parâmetros que foram utilizados nos estímulos e medidos nas respostas. Observe que as barras das escalas de amplitude e tempo são diferentes para os protocolos escotópico e fotópico.....92

Figura 20. ERG escotópico. Os quadrados com linhas pontilhadas representam os limites normais da onda-b (média $\pm$ um desvio padrão) para a amplitude (linhas verticais) e o tempo implícito (linhas horizontais) obtidos com os resultados dos controles. Resposta de um sujeito representativo do grupo controle (A), e respostas de três jovens com DMD: um jovem *upstream* 30 (B) e dois jovens *downstream* 30 (C e D).....95

Figura 21. Amplitude (acima) e tempo implícito (abaixo) da onda-b do ERG escotópico. Quadrado: média $\pm$ um desvio padrão dos resultados dos controles; círculos vazios: resultados de dois DMDs *upstream* 30; círculos cheios: resultados dos seis DMDs *downstream* 30. Observe que os resultados de amplitude dos DMDs

downstream 30 estão sobrepostos. As amplitudes de todos os jovens com DMD encontram-se reduzidas em relação aos controles. Dois jovens com DMD *downstream* 30 apresentaram, além da amplitude reduzida, tempos implícitos atrasados e em outros dois não foi possível medir o tempo implícito devido à amplitude muito reduzida ($< 2 \mu V$). *diferença estatisticamente significativa entre controles e DMDs *downstream* 30.....96

Figura 22. ERG fotópico. Os quadrados com linhas pontilhadas representam os limites normais para a amplitude (linhas verticais) e o tempo implícito (linhas horizontais) da onda-a e da onda-b obtidos pela média $\pm$ um desvio padrão dos controles. Registro individual de um sujeito representativo do grupo controle (A), e registros individuais de três jovens com DMD: um jovem *upstream* 30 (B) e dois jovens *downstream* 30 (C e D).....99

Figura 23. Amplitude (acima) e tempo implícito (abaixo) da onda-a (esquerda) e onda-b (direita) do ERG fotópico. Quadrado: média $\pm$ um desvio padrão dos resultados dos controles; círculos vazios: resultados de dois DMDs *upstream* 30; círculos cheios: resultados de seis DMDs *downstream* 30. Observe que houve sobreposição dos resultados. Para a onda-a os resultados foram semelhantes. Para a onda-b houve redução da amplitude de resposta, com tempo implícito semelhante. *diferença estatisticamente significativa entre controles e DMDs *downstream* 30.....100

Figura 24. Amplitude (acima) e tempo implícito (abaixo) do PO1 (esquerda) e do PO2 (direita) do ERG fotópico. Quadrado: média $\pm$ um desvio padrão dos resultados dos controles; círculos vazios: resultados de dois DMDs *upstream* 30; círculos cheios: resultados de DMDs *downstream* 30. Observe que houve sobreposição dos resultados em alguns casos. Para ambos os POs houve redução da amplitude sem atraso da resposta. *diferença estatisticamente significativa entre controles e DMDs *downstream* 30.....101

Figura 25. Amplitude (acima) e tempo implícito (abaixo) da RFN do ERG fotópico. Quadrado: média $\pm$ um desvio padrão dos resultados dos controles; círculos vazios: resultados de dois DMDs *upstream* 30; círculos cheios: resultados de DMDs *downstream* 30. Observe que houve sobreposição dos resultados em alguns casos. Houve redução da amplitude sem atraso da resposta. *diferença estatisticamente significativa entre controles e DMDs *downstream* 30.....102

Figura 26. ERG mesópico ON. Resposta de um sujeito representativo do grupo controle (A), e respostas de três jovens com DMD: um jovem *upstream* 30 (B) e dois jovens *downstream* 30 (C e D). Abaixo está representada a modulação temporal da luminância do estímulo em forma de dente de serra.....104

Figura 27. Amplitude de respostas em relação ao tempo implícito para o protocolo mesópico ON. Os quadrados cinzas representam os resultados individuais de 30 sujeitos do grupo controle; os círculos vazios representam os resultados de dois jovens com DMD *upstream* 30; os círculos cheios representam os resultados individuais de oito jovens com DMD *downstream* 30 (considerando que dois jovens não apresentaram picos de respostas para a onda-b). Observe que para a onda-a as amplitudes foram semelhantes entre controles e pacientes, entretanto o tempo

implícito apresentou-se muito variável. Para a onda-b, a amplitude dos jovens com DMD apresentou-se reduzida em relação aos controles e alguns jovens apresentaram tempos implícitos atrasados.....105

Figura 28. Amplitude (acima) e tempo implícito (abaixo) da onda-a (esquerda) e onda-b (direita) do ERG mesópico ON. Quadrado: média $\pm$ um desvio padrão dos resultados dos controles; círculos vazios: resultados de dois DMDs *upstream* 30; círculos cheios: resultados de oito DMDs *downstream* 30. Observe que para o tempo implícito dos controles em ambas as ondas o desvio padrão não aparece porque é pequeno (onda-a = $\pm$ 3,6 ms e onda-b = $\pm$ 10 ms). O tempo implícito da onda-a foi estatisticamente diferente entre controles e DMDs *downstream* 30. Para a onda-b, a amplitude apresentou redução significativa para os jovens com DMD. O tempo implícito da onda-b foi semelhante para alguns jovens com DMD e para outros foi atrasado. *diferença estatisticamente significativa entre controles e DMDs *downstream* 30.....107

Figura 29. ERG mesópico OFF. Resposta de um sujeito representativo do grupo controle (A), e de três jovens com DMD: um jovem *upstream* 30 (B) e dois jovens *downstream* 30 (C e D). Abaixo está representada a modulação temporal da luminância do estímulo em forma de dente de serra.....109

Figura 30. ERG mesópico OFF. Amplitude e tempo implícito para os controles (n=30; quadrados cinza); dois jovens com DMD *upstream* 30 (círculos vazios); quatro jovens com DMD *downstream* 30 (círculos cheios). Observe que as amplitudes estão reduzidas para os jovens com DMD em relação aos controles, entretanto os tempos implícitos são semelhantes.....110

Figura 31. Amplitude (acima) e tempo implícito (abaixo) da onda-b do ERG mesópico OFF. Quadrado: média $\pm$ um desvio padrão dos resultados dos controles; círculos vazios: resultados de dois DMDs *upstream* 30; círculos cheios: resultados de DMDs *downstream* 30. As amplitudes dos jovens com DMD *downstream* 30 encontram-se reduzidas em relação aos controles. Os dois jovens com DMD *upstream* 30 apresentaram respostas normais. O tempo implícito foi semelhante para controles e jovens com DMD. *diferença estatisticamente significativa entre controles e DMDs *downstream* 30.....111

Figura 32. ERG fotópico ON. Resposta de um sujeito representativo do grupo controle (A), e respostas de três jovens com DMD: um jovem *upstream* 30 (B) e dois jovens *downstream* 30 (C e D). Abaixo está representada a modulação temporal da luminância do estímulo em forma de dente de serra.....113

Figura 33. Resultados de amplitude de resposta em relação ao tempo implícito para o protocolo fotópico ON. Os quadrados cinzas representam os resultados individuais de 30 sujeitos do grupo controle; os círculos vazios representam os resultados de dois jovens com DMD *upstream* 30; os círculos cheios representam os resultados individuais de jovens com DMD *downstream* 30 (considerando que um jovem não apresentou picos de respostas para as ondas-a e -b). Observe que para a onda-a as amplitudes e os tempos implícitos foram semelhantes entre controles e pacientes. Entretanto, para a onda-b, a amplitude dos jovens com DMD apresentou-se reduzida em relação aos controles sem alteração no tempo implícito.....114

Figura 34. Amplitude (acima) e tempo implícito (abaixo) da onda-a (esquerda) e onda-b (direita) do ERG fotópico ON. Quadrado: média $\pm$ um desvio padrão dos resultados dos controles; círculos vazios: resultados de dois DMDs *upstream* 30; círculos cheios: resultados de DMDs *downstream* 30. Observe que há sobreposição dos pontos nos resultados de DMDs *downstream* 30. Para a onda-a apenas os DMDs *upstream* 30 apresentaram amplitudes reduzidas. O tempo implícito da onda-a foi semelhante para todos os sujeitos exceto um jovem com DMD *upstream* 30. Para a onda-b, houve redução significativa da amplitude para os jovens com DMD. O tempo implícito da onda-b foi estatisticamente semelhante para todos os sujeitos. *diferença estatisticamente significativa entre controles e DMDs *downstream* 30.....116

Figura 35. ERG fotópico OFF. Resposta de um sujeito representativo do grupo controle (A), e respostas de três jovens com DMD: um jovem *upstream* 30 (B) e dois jovens *downstream* 30 (C e D). Abaixo está representada a modulação temporal da luminância do estímulo em forma de dente de serra.....118

Figura 36. ERG fotópico OFF. Amplitude e tempo implícito para os controles (n=30; quadrados cinza); dois jovens com DMD *upstream* 30 (círculos vazios); jovens com DMD *downstream* 30 (círculos cheios). Observe que as amplitudes acima de 100 μ V são resultados de quatro sujeitos do grupo controle mais jovens (idades entre 8 e 12 anos).....119

Figura 37. Amplitude (acima) e tempo implícito (abaixo) da onda-d do ERG fotópico OFF. Quadrado: média $\pm$ um desvio padrão dos resultados dos controles; círculos vazios: resultados de dois DMDs *upstream* 30; círculos cheios: resultados de DMDs *downstream* 30. Não houve diferença estatística significativa entre jovens com DMD e controles para a amplitude e o tempo implícito. Observe que há sobreposição dos pontos no gráfico do tempo implícito.....120

Figura 38. Gráficos de correlação da idade com os resultados do ERG do grupo controle. Houve correlação negativa para o tempo implícito da onda-b tanto do ERG fotópico (A) como do ERG fotópico ON (B). Além disso, houve correlação negativa entre a idade e a amplitude da onda-b do ERG mesópico OFF (C).....123

Figura 39. Região de alteração no gene da distrofina para cada jovem com DMD avaliado (esquerda) e resultado normal (N) ou alterado (A) para as amplitudes da onda-b (ERG escotópico, fotópico, mesópico ON, mesópico OFF e fotópico ON) e da onda-d (ERG fotópico OFF). No ERG escotópico todos os jovens apresentaram onda-b alterada e no ERG fotópico apenas um jovem com DMD *downstream* 30 apresentou a onda-b normal. Os tracinhos indicam que dois jovens não realizaram os protocolos do ERG de flash. Nos protocolos mesópicos, dois jovens, um *downstream* 30 e outro *upstream* 30 apresentaram onda-b normal e quatro jovens, entre eles os dois jovens *upstream* 30 apresentaram onda-b do ERG mesópico OFF normal. No ERG fotópico ON apenas um jovem *downstream* 30 apresentou onda-b normal e no ERG fotópico OFF sete dos 10 jovens com DMD avaliados apresentaram a onda-d normal.....124

Figura 40. Resultados de sensibilidade ao contraste positivo (acima) e negativo (abaixo) do teste do xadrez. Quadrado: média $\pm$ um desvio padrão dos resultados dos controles; círculos abertos: resultados de dois DMDs *upstream* 30; círculos cheios: resultados de 17 DMDs *downstream* 30. Os jovens com DMD apresentaram limiares reduzidos em comparação aos controles. A diferença foi significativa para os protocolos magno-ON (acima e à esquerda) e parvo-ON (acima e à direita). *diferença estatisticamente significativa entre controles e DMDs *downstream* 30.....126

Figura 41. Resultados de sensibilidade ao contraste normalizados pela média do grupo controle para os dois protocolos do xadrez nos quais houve redução estatística para os resultados dos jovens com DMD. Resultados abaixo da linha pontilhada representam sensibilidade reduzida em relação à media dos controles.....127

Figura 42. Resultados de sensibilidade ao contraste espacial de luminância. Quadrado: média $\pm$ um desvio padrão dos resultados dos controles; círculos vazios: resultados de dois DMDs *upstream* 30; círculos cheios: resultados de 17 DMDs *downstream* 30. Os jovens com DMD apresentaram sensibilidade reduzida em comparação aos controles e essa diferença foi significativa para as frequências espaciais 6,5 cpg (acima e à direita) e 12,5 cpg (abaixo e à direita). *diferença estatisticamente significativa entre controles e DMDs *downstream* 30.....129

Figura 43. Resultados de sensibilidade ao contraste normalizados pela média do grupo controle para as duas frequências espaciais de luminância nas quais houve redução estatística para os jovens com DMD. Resultados abaixo da linha pontilhada representam sensibilidade reduzida em relação à media dos controles.....130

Figura 44. Resultados de sensibilidade ao contraste temporal de luminância. Quadrado: média $\pm$ um desvio padrão dos resultados dos controles; círculos vazios: resultados de dois DMDs *upstream* 30; círculos cheios: resultados de 17 DMDs *downstream* 30. Os jovens com DMD apresentaram sensibilidade reduzida em comparação aos controles para a frequência temporal de 20 Hz. *diferença estatisticamente significativa entre controles e DMDs *downstream* 30.....132

Figura 45. Resultados de sensibilidade ao contraste normalizados pela média do grupo controle para o protocolo do contraste temporal de luminância no qual houve redução estatística para os jovens com DMD. Resultados abaixo da linha pontilhada representam sensibilidade reduzida em relação à media dos controles.....133

Figura 46. Gráficos de correlação da idade com os resultados do teste do xadrez do grupo controle. Houve correlação negativa para os protocolos magno-ON e parvo-ON (A e B) e houve correlação positiva para os protocolos magno-OFF e parvo-OFF (C e D).....135

Figura 47. Gráficos de correlação da idade com os resultados dos testes de sensibilidade ao contraste espacial e temporal de luminância do grupo controle. Houve correlação negativa para as duas frequências espaciais mais baixas (A e B) e para a frequência temporal mais baixa (C).....1

Figura 48. Região de alteração no gene da distrofina para cada jovem com DMD avaliado (esquerda) e resultado normal (N) ou alterado (A) para a sensibilidade ao contraste positivo (magno-ON e parvo-ON) e para a sensibilidade ao contraste espacial e temporal de luminância. No protocolo magno-ON, seis dos 19 jovens com DMD apresentaram sensibilidade abaixo da linha inferior e no protocolo parvo-ON, oito dos 19 jovens. Ambos os jovens *upstream* 30 apresentaram resultados dentro dos limites esperados. Para o teste de sensibilidade ao contraste espacial de luminância, 13 jovens apresentaram sensibilidade abaixo do limite inferior dos controles em, ao menos, uma das frequências espaciais avaliadas. Observe que um dos jovens é *upstream* 30. Para o teste de sensibilidade ao contraste temporal de luminância, seis jovens apresentaram sensibilidade abaixo do limite inferior dos controles em, ao menos, uma das frequências temporais avaliadas. Os dois jovens *upstream* 30 apresentaram resultados dentro do esperado para o teste de sensibilidade ao contraste temporal de luminância.....137

Figura 49. Análise imunohistoquímica detecta a distrofina em 3 locais na retina de camundongos: (a) camada plexiforme externa, endotélio de vasos sanguíneos (asteriscos) e bordas entre retina e a membrana limitante interna (setas brancas) refletindo uma alta concentração no terminal das células de Müller; em (b) ampliação para melhor demonstração da marcação observada na camada plexiforme externa, correspondendo aos terminais sinápticos de cones e bastonetes; esquema didático da retina (meio) e desenho da localização da distrofina (linha azul) nas três estruturas da retina: região invaginada do terminal sináptico do fotorreceptor, astrócito e células gliais de Müller (à direita). Modificada de Blake & Kröger (2000)......158

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais diferenças entre cones e bastonetes.....	43
Tabela 2. Idades e resultados dos testes de DNA, QI e AV dos 19 jovens com DMD que foram incluídos do estudo.....	75
Tabela 3. Resultados de amplitude e tempo implícito do ERG escotópico para o grupo controle e para os jovens com DMD.....	94
Tabela 4. Resultados de amplitude e tempo implícito da onda-a e da onda-b do ERG fotópico para o grupo controle e para os jovens com DMD.....	100
Tabela 5. Resultados de amplitude e tempo implícito do PO1 e do PO2 do ERG fotópico para o grupo controle e para os jovens com DMD.....	101
Tabela 6. Resultados de amplitude e tempo implícito para a resposta fotópica negativa do ERG fotópico para o grupo controle e para os jovens com DMD.....	102
Tabela 7. Resultados de amplitude e tempo implícito da onda-a e da onda-b do ERG mesópico ON para o grupo controle e para os jovens com DMD.....	107
Tabela 8. Resultados de amplitude e tempo implícito do ERG mesópico OFF para o grupo controle e para os jovens com DMD.....	111
Tabela 9. Resultados de amplitude e tempo implícito da onda-a e da onda-b do ERG fotópico ON para o grupo controle e para os jovens com DMD.....	116
Tabela 10. Resultados de amplitude e tempo implícito do ERG fotópico OFF para o grupo controle e para os jovens com DMD.....	120
Tabela 11. Resultados de sensibilidade ao contraste do teste do xadrez de controles e jovens com DMD.....	127
Tabela 12. Resultados de sensibilidade ao contraste espacial de luminância de controles e jovens com DMD.....	130
Tabela 13. Resultados de sensibilidade ao contraste temporal de luminância de controles e jovens com DMD.....	133

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AV	Acuidade Visual
BMD	Distrofia muscular de Becker
CCT	<i>Cambridge Colour Test</i>
CK	Enzima creatinoquinase
CMD	Distrofia muscular congênita
Cpg	Ciclos por grau
DMD	Distrofia muscular de Duchenne
Dp	<i>Dystrophin protein</i>
EEG	Eletroencefalograma
ERG	Eletrorretinograma
ISCEV	<i>International Society for Clinical Electrophysiology of Vision</i>
K	Koniocelular
LED	<i>Light Emitting Diode</i>
M	Magnocelular
Mdx	<i>X-linked muscular dystrophy</i>
NGL	Núcleo Geniculado Lateral
P	Parvocelular
PO	Potencial Oscilatório
QI	Quociente de Inteligência
RFN	Resposta Fotópica Negativa
SC	Sensibilidade ao Contraste

SUMÁRIO

PREFÁCIO.....	29
1. INTRODUÇÃO.....	31
1.1 DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE.....	31
1.2 O SISTEMA VISUAL NA DMD.....	39
1.2.1 O INÍCIO DO PROCESSAMENTO VISUAL E A PRESENÇA DA DISTROFINA NA CAMADA PLEXIFORME EXTERNA DA RETINA.....	41
1.2.2 A DISTROFINA EXPRESSA PELAS CÉLULAS GLIAIS DA RETINA..	54
1.2.3 CIRCUITOS RETINIANOS	56
1.2.4 O ERG NA DMD	60
1.2.5 VIA RETINO-GENICULO-CORTICAL E O POTENCIAL CORTICAL VISUAL PROVOCADO EM JOVENS COM DMD.....	66
1.2.6 ALTERAÇÕES EM FUNÇÕES VISUAIS CAUSADAS PELA DMD.....	69
1.3 JUSTIFICATIVA.....	70
2. OBJETIVO GERAL.....	72
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	72
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	73
3.1 PARTICIPANTES.....	73
3.2 AVALIAÇÃO ELETROFISIOLÓGICA – ERG DE CAMPO TOTAL	76
3.3 AVALIAÇÃO PSICOFÍSICA - SENSIBILIDADE AO CONTRASTE	83
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	89
4. RESULTADOS	90
4.1 AVALIAÇÃO ELETROFISIOLÓGICA.....	90
4.1.1 ERG ESCOTÓPICO	93
4.1.2 ERG FOTÓPICO	97
4.1.3 ERG MESÓPICO ON	103
4.1.4 ERG MESÓPICO OFF	108

4.1.5	ERG FOTÓPICO ON.....	112
4.1.6	ERG FOTÓPICO OFF	117
4.1.7	CORRELAÇÕES	121
4.2	AVALIAÇÃO PSICOFÍSICA	125
4.2.1	TESTE DO XADREZ	125
4.2.2	SENSIBILIDADE AO CONTRASTE ESPACIAL DE LUMINÂNCIA....	128
4.2.3	SENSIBILIDADE AO CONTRASTE TEMPORAL DE LUMINÂNCIA..	131
4.2.4	CORRELAÇÕES	134
5.	DISCUSSÃO	138
5.1	AVALIAÇÃO ELETROFISIOLÓGICA.....	139
5.1.1	O ERG DE FLASH NA DMD	139
5.1.2	O ERG ON E OFF NA DMD	145
5.2	AVALIAÇÃO PSICOFÍSICA	151
5.3	RELAÇÃO DOS RESULTADOS COM A LOCALIZAÇÃO DA DISTROFINA NA RETINA.....	157
5.4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	163
6.	CONCLUSÕES.....	164
	REFERÊNCIAS.....	165
	ANEXOS	189

PREFÁCIO

O presente projeto foi planejado para dar continuidade ao estudo anterior que correspondeu ao trabalho de doutorado do Professor Doutor Marcelo Fernandes da Costa (Costa, 2004) e é parte do projeto intitulado “Estudo eletrofisiológico, psicofísico e neuropsicológico em jovens com distrofia muscular de Duchenne”. A parte de avaliação neuropsicológica do projeto correspondeu ao trabalho de doutorado da Doutora Elaine Cristina Zachi (Zachi, 2009).

O estudo desenvolveu-se no Laboratório da Visão – Eletrofisiologia e Psicofísica Visual Clínica do Departamento de Psicologia Experimental no Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo (IP/USP), coordenado pela Professora Titular Dora Fix Ventura, orientadora dessa tese de doutoramento.

1. Introdução

1.1 Distrofia Muscular de Duchenne

As distrofias musculares são provocadas por mutações genéticas que alteram o funcionamento do complexo de proteínas associadas à distrofina (Campbell, 1995; Blake, Weir, Newey, & Davies, 2002). Elas reúnem um conjunto de características clínicas que variam conforme o tipo de alteração genética e que resultam em diferentes graus de severidade da doença (Vainzof et al., 1990; Vainzof et al., 1993a e b; O'Brien & Kunkel, 2001). Walton (1954) definiu as distrofias musculares como doenças de origem hereditária, caracterizadas pela atrofia e fraqueza muscular progressiva relacionada com a degeneração e necrose das fibras musculares, o aumento do tecido conjuntivo e as infiltrações de gordura entre as fibras musculares. A distrofia muscular de Duchenne (DMD), por exemplo, manifesta-se a partir do início da infância e apresenta evolução rápida, enquanto na distrofia muscular de Becker (BMD) os sintomas se iniciam em idades mais avançadas e a evolução da doença é relativamente lenta (Emery, 2001).

As descrições mais antigas sobre os aspectos clínicos da DMD foram publicadas em meados do século XIX. Primeiramente, o anatomista e cirurgião escocês Charles Bell (1774-1842) publicou o livro "*The nervous system of the human body*" em 1830 no qual incluiu a descrição de um jovem de 18 anos de idade que apresentava fraqueza muscular progressiva desde os 10 anos. Embora na época da publicação o diagnóstico não tivesse sido estabelecido, mais tarde a descrição clínica da doença foi considerada característica da DMD. Posteriormente, o médico inglês Edward Meryon (1809-1880) descreveu uma doença caracterizada

pela perda e fraqueza progressiva dos músculos e de aparecimento durante o início da infância que causava a morte prematura no final da adolescência. Os achados clínicos foram publicados em 1864 no livro "*Practical and pathological researches on the various forms of paralysis*". Na década de 1860, o neurologista francês Guillaume Benjamin Amand Duchenne (1806-1875) descreveu detalhes da histologia muscular, dos aspectos clínicos e da progressão de uma doença que, mais tarde (em 1955) passou a ser associada ao seu nome (Emery & Emery, 1993).

Nas três últimas décadas o gene causador da DMD, localizado no cromossomo X, foi descoberto (Koenig et al., 1987; Zatz, Vianna-Morgante, Campos, & Diament, 1981), a proteína responsável pela doença foi identificada (Hoffman, Brown, Jr., & Kunkel, 1987a; Hoffman et al., 1988) e seus aminoácidos foram sequenciados (Hoffman, Monaco, Feener, & Kunkel, 1987; Koenig, Monaco, & Kunkel, 1988). Estudos mais recentes sugerem que além de ser uma doença degenerativa muscular, a DMD também é resultado de um processo multifatorial que ocorre devido ao defeito estrutural acompanhado pela diminuição progressiva do potencial regenerativo do tecido muscular (Sacco et al., 2010; Chamberlein, 2010).

A DMD é considerada a mais comum das distrofias musculares que afetam os seres humanos. Sua incidência mundial é de aproximadamente um para cada 3500 nascidos vivos do sexo masculino (Blake & Kroger, 2000; Emery, 2001; Moser, 1984). Por ser uma doença genética recessiva ligada ao cromossomo X, na maioria dos casos a doença é transmitida ao filho do sexo masculino pela mãe portadora (heterozigota). Entretanto, um terço dos casos é causado por mutações novas (Barbujani et al., 1990; Zatz, Lange, & Spence, 1977). Deleções ou duplicações

gênicas ocorrem na maior parte dos pacientes, mas 30% dos pacientes possuem mutação de ponto (Verbovaia & Razin, 1997; Sitnik et al., 1997).

Entre as características clínicas apresentadas por jovens com DMD estão os altos níveis sanguíneos da enzima creatinoquinase (CK) que é liberada pelos músculos mesmo antes dos sinais de fraqueza muscular, pseudohipertrofia do músculo da panturrilha, diminuição da habilidade física e dificuldade para realizar alguns movimentos a partir dos três anos de idade (Jay & Vajsar, 2001). Normalmente, os jovens com DMD são considerados clinicamente saudáveis ao nascimento, mas no início da infância a deficiência dos músculos esqueléticos aparece e agrava-se rapidamente. Dessa maneira, o jovem com DMD torna-se dependente da cadeira de rodas no início da adolescência (Emery, 1998) e o óbito ocorre, geralmente, por insuficiência cardíaca ou respiratória entre a segunda e a terceira década de vida (Hauser & Chamberlain, 1996; Luz, Marques, & Santo Neto, 2002; Vainzof & Zatz, 2003).

A DMD é causada por alteração do gene responsável pela proteína distrofina (Koenig et al., 1987; Hoffman et al., 1987; Nicholson et al., 1993; Bushby, 1992; Brown, 1997). O gene da distrofina é considerado o maior dos aproximadamente 30 mil genes que formam o genoma humano. Possui 2,4 milhões de bases e representa 0,1% do genoma humano (*Human Genome Project*). O gene localiza-se na região 21 do braço curto do cromossomo sexual X (local Xp21), é composto por 79 exons e apresenta uma extensa região codificadora (Bettecken, Aissani, Müller, & Bernardi, 1992).

A figura 1 apresenta um esquema da localização do gene da distrofina no cromossomo X com os sete promotores dos quais três, chamados B, M e P, são responsáveis pela transcrição da proteína completa (Dp427) com 3685 aminoácidos

distribuídos em 180 nm de comprimento. O promotor B encontra-se principalmente ativo em neurônios do córtex cerebral e do hipocampo; o promotor M nos músculos esqueléticos, cardíacos, células vasculares endoteliais e células gliais do sistema nervoso central; e o promotor P nas células cerebelares de Purkinje e em neurônios no córtex cerebral fetal (Blake & Kroger, 2000; Essex & Roper, 2001; Fortina et al., 1997; Mehler, 2000; Nobile, Marchi, Nigro, Roberts, & Danieli, 1997). Cada promotor está associado à respectiva proteína que expressa: Dp427 (B), Dp427 (M) e Dp427 (P). A letra no nome da proteína indica o local de expressão: B = *brain*, M = *muscle* e P = *Purkinje cells*. A diferença entre os três tipos de proteínas Dp427 está na sequência dos aminoácidos de um de seus domínios, o terminal N (Blake et al., 2002).

O gene da distrofina possui ao menos quatro locais de transcrições intragênicas menores iniciadas por outros promotores que utilizam um único exon de referência (R = 30, B₃ = 45, S = 56 ou G = 63), responsável pelo início da transcrição (Muntoni, Torelli, & Ferline, 2003). O promotor R possui como principal sítio de expressão a camada plexiforme externa da retina, o promotor B₃, as células cerebrais, o promotor S, as células de Schwann e o promotor G, as células gliais. Esses quatro promotores são responsáveis pelas isoformas menores da distrofina cujos nomes representam os respectivos pesos moleculares: Dp260, Dp140, Dp116 e Dp71 (Muntoni et al., 2003; Ahn & Kunkel, 1993).

A figura 2 mostra o complexo formado por cinco classes de proteínas (sarcoglicano, distroglicano, sarcospano, sintrofinas e distrobrevinas) no qual a distrofina encontra-se inserida. No tecido muscular, a distrofina localiza-se na porção intracelular do complexo e possui estrutura tradicionalmente dividida em quatro domínios funcionais: i) terminal N, que se liga à actina; ii) repetição estrutural

em forma de bastão, responsável pela flexibilidade da proteína; iii) cisteínas, relacionadas às funções estruturais da proteína; e iv) terminal C (Michalak & Opas, 1997). Nos músculos, o terminal C da distrofina se liga às outras proteínas do complexo (Tinsley et al., 1993; Tinsley, Blake, Zuellig, & Davies, 1994). As três principais funções conhecidas do complexo são: i) estabilidade estrutural da membrana plasmática; ii) homeostase de íons; e iii) sinalização transmembrânica (para revisão: Haenggi & Fritschy, 2006).

O prejuízo mais grave causado pela DMD ocorre nos músculos esqueléticos e cardíacos, porque nesses tecidos a Dp427 possui função estrutural, mantendo a integridade da membrana celular durante os ciclos de contração e alongamento da fibra muscular (Blake & Kroger, 2000; Campbell & Kahl, 1991; Chelly et al., 1990; Koenig et al., 1988). Em tecidos neurais, as proteínas Dp427 e Dp140 participam da sinaptogênese e da homeostase de Ca^{2+} . Elas encontram-se associadas aos canais iônicos dos neurônios (Haenggi & Fritschy, 2006; Lidov, Byers, Watkins, & Kunkel, 1990; Mehler, 2000), além da função durante a sinaptogênese (Chelly, Kaplan, Maire, Gautron, & Kahn, 1988; Lidov et al., 1990; Lidov & Kunkel, 1997; Morris, Simmons, & Man, 1995). A Dp140 no cérebro é expressa predominantemente durante o desenvolvimento cerebral fetal, sugerindo relação entre a sua expressão e o desenvolvimento cognitivo normal (Anderson, Head, Rae, & Morley, 2002; Bardoni et al., 2000; Pilgram, Potikanond, Baines, Fradkin, & Noordermeer, 2010).

Figura 1. Acima: representação da localização do gene da distrofina no cromossomo X (Xp21). Meio: linhas pretas verticais representam os 79 exons distribuídos em 2,5 milhões de bases; as setas indicam os sete promotores: os promotores B, M e P responsáveis pela transcrição da distrofina completa Dp427. O local de início da transcrição do promotor muscular é considerado a primeira base do gene e as transcrições das outras isoformas são iniciadas por promotores localizados em outras regiões do gene: promotores R (*retinal*), B₃ (*brain₃*), S (*Schwann cells*) e G (*general*) que são responsáveis pelas isoformas Dp260, Dp140, Dp116 e Dp71, respectivamente. Abaixo: representação das diferentes isoformas da proteína. Modificado de Muntoni et al. (2003).

A morfologia macroscópica do córtex cerebral na DMD não apresenta alterações, mas algumas mudanças estruturais microscópicas, como diminuição da arborização dendrítica de neurônios piramidais, foram observadas (Yoshioka, Okuno, Honda, & Nakano, 1980; Bresolin et al., 1994). Aproximadamente 30% dos jovens com DMD apresentam retardo mental associado principalmente à alteração genética que causa disfunção da isoforma Dp140 (Gilberto, Ferreiro, Dalamon, & Szijan, 2004; Moizard et al., 1998). A DMD também está associada com prejuízos neuropsicológicos em habilidades verbais (vocabulário, compreensão, cálculos mentais), em funções executivas e na memória visuo-espacial (Billard, Gillet, Barthez, Hommet, & Bertrand, 1998; Bresolin et al., 1994; Moura, do Valle, Resende, & Pinto, 2010; Roque, Teixeira, Zachi, & Ventura, 2011; Zachi, 2009; Zachi, Taub, Costa, Oiwa, & Ventura, 2009; Zachi, Costa, Taub, & Ventura, 2010, 2011).

Outras isoformas da distrofina são expressas em diferentes grupos celulares, como por exemplo, nas células de Schwann (Dp116), responsáveis pela produção da mielina no sistema nervoso periférico (Byers, Lidov, & Kunkel, 1993). A isoforma Dp71 encontra-se amplamente distribuída em diversos grupos celulares, como por exemplo, fígado, pulmão, rim, etc. (Bar et al., 1990). Finalmente, a isoforma Dp260 é expressa principalmente na retina e está principalmente relacionada com a comunicação sináptica na camada plexiforme externa (D'Souza et al., 1995).

1.2 O sistema visual na DMD

No sistema visual a disfunção da distrofina está associada às alterações eletrofisiológicas retinianas encontradas tanto em modelos animais da DMD (Cibis, Fitzgerald, Harris, Rothberg, & Rupani, 1993; Pillers et al., 1995; Drenckhahn, Holbach, Ness, Schmitz, & Anderson, 1996; Schmitz & Drenckhahn, 1997a) como em pacientes. Jovens com DMD apresentam redução da amplitude da onda-b do eletrorretinograma (ERG) escotópico (Cibis et al., 1993; Costa, 2004; Debecker, Riddell, Dooley, & Tremblay, 1994; Fitzgerald, Cibis, Giambrone, & Harris, 1994; Girlanda et al., 1997; Pascual-Pascual, Molano, & Pascual-Castroviejo, 1998; Pillers et al., 1993; Sigesmund et al., 1994).

Inicialmente este fenótipo visual foi associado à forma incompleta (Miyake, Yagasaki, Horiguchi, Kawase, & Kanda, 1986) da cegueira noturna estacionária congênita (em inglês, CSNB) porque acreditava-se que a alteração retiniana estaria relacionada a um gene localizado também na região Xp21 do cromossomo X e, portanto, o gene estaria afetado na DMD (Weleber et al., 1989). Entretanto, jovens com DMD apresentam adaptação ao escuro normal, incompatível com o diagnóstico de CSNB (Jensen, Warburg, Sjo, & Schwartz, 1995). Neste contexto, um estudo foi conduzido utilizando o ERG fotópico com flash de longa duração para avaliar a contribuição das vias visuais ON e OFF da retina e para diferenciar o perfil de respostas de jovens com DMD da resposta de pacientes com CSNB. Os autores mostraram que na DMD a via visual ON dos cones mantém parte de sua função preservada (Fitzgerald et al., 1994).

No início da década de 1990, surgiram evidências de que a distrofina seria expressa no sistema nervoso central (Lidov et al., 1990). Essa evidência contribuiu para a hipótese de que as alterações retinianas encontradas em jovens com DMD estariam associadas à deficiência da distrofina e não às alterações de genes adjacentes (Cibis et al., 1993; DeBecker, Dooley, & Trembley, 1993; Fitzgerald, Cibis, Harris, & Rothberg, 1993; Pillers et al., 1993; Jensen et al., 1995; Cibis & Fitzgerald, 2001). Atualmente sabe-se que o gene relacionado à CSNB não se localiza na região Xp21 do cromossomo X, mas em outra região do mesmo cromossomo, como a região Xp11,3 (Alitalo, Kruse, Forsius, Eriksson, & Delachapelle, 1991; Musarella et al., 1989) e que as alterações no ERG de campo total de jovens com DMD ocorrem pela disfunção da distrofina na retina.

Apesar das alterações do ERG de campo total serem consideradas manifestações não musculares características da DMD (Cibis et al., 1993), os jovens com DMD são considerados assintomáticos do ponto de vista oftalmológico porque apresentam acuidade visual normal, a retina sem alterações ao exame de fundoscopia (Sigesmund et al., 1994; Debecker et al., 1994) e movimentos oculares preservados (Khurana et al., 1995; Kaminski, Alhakim, Leigh, Katirji, & Ruff, 1992; Wiesen, Bogdanovich, Agarkova, Perriard, & Khurana, 2007).

Nas últimas três décadas, estudos mostraram que a distrofina existe na retina (Miike, Miyatake, Zhao, Yoshioka, & Uchino, 1989; Chelly et al., 1990; Tamura, Yoshioka, Jinno, Niikawa, & Miike, 1993; D'Souza et al., 1995; Schmitz & Drenckhahn, 1997a e b; Ueda et al., 1997a e b; Ueda, Baba, Kashiwagi, Lijima, & Ohno, 2000a; Ueda, Baba, & Ohno, 2000b; Claudepierre et al., 1999),

é necessária para a geração de respostas eletrofisiológicas normais (Pillers et al., 1993; Cibis et al., 1993; Costa, 2004; Fitzgerald et al., 1994; Girlanda et al., 1997; Pascual-Pascual et al., 1998; Sigismund et al., 1994) e para funções visuais básicas, como a visão de cores e de contrastes (Costa, Oliveira, Feitosa-Santana, Zatz, & Ventura, 2007b; Costa, Barboni, & Ventura, 2011). Entretanto, a função celular da distrofina e sua relação com as alterações fisiológicas retinianas decorrentes da deficiência de sua expressão permanecem inconclusivas.

1.2.1 O início do processamento visual e a presença da distrofina na camada plexiforme externa da retina

O processamento da informação visual em vertebrados inicia-se na retina. A Figura 3A apresenta um desenho da secção transversal do globo ocular humano destacando suas principais estruturas. A Figura 3B apresenta um desenho simplificado dos principais grupos celulares da retina, que serão apresentados a seguir.

As camadas mais externas da retina são formadas por grupos celulares que efetuam os primeiros estágios do processamento da informação visual: fotorreceptores, células bipolares ON e OFF e células horizontais. O trabalho fundamental dos fotorreceptores é transformar a luz (energia eletromagnética) em sinal neural através do processo de fototransdução. Resumidamente, o processo de fototransdução resulta na modulação da liberação do neurotransmissor glutamato pelos fotorreceptores. Os fotorreceptores não produzem potenciais de ação, mas respondem à estimulação luminosa através

de mudanças graduais de seus potenciais de membrana. Os fotorreceptores presentes na retina de mamíferos são os cones e os bastonetes, localizados na camada mais externa da retina, a camada de fotorreceptores, e as células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis, ou células ganglionares de melanopsina, localizadas principalmente na camada de células ganglionares da retina, mas também, em menor número, na camada nuclear interna (Dacey et al., 2005). Os cones e bastonetes são o elo inicial do sistema de visão, ou sistema que forma imagens, enquanto as células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis participam do sistema ativado por luz, mas que não forma imagens e tem funções ligadas ao ritmo circadiano e ao controle do reflexo pupilar, dentre outras funções que não requerem a formação de imagens (Dacey et al., 2005). Tanto os cones como os bastonetes hiperpolarizam na presença de luz, mas apresentam diferenças anatômicas e funcionais (Wald, 1964; Brown & Wald, 1964; Baylor, 1987; Wässle & Boycott, 1991). A Tabela 1 apresenta de forma resumida as principais diferenças entre cones e bastonetes (Joselevitch, 2008).

Tabela 1. Principais diferenças entre cones e bastonetes.

	Cones	Bastonetes
Morfologia geral	segmento externo cônico	segmento externo cilíndrico
Fotopigmento	opsinas de cones	rodopsina
Número de fitas sinápticas	20-40 ⁽¹⁾	1-2 ⁽²⁾
Nível de luz	fotópico	escotópico
Sensibilidade absoluta	baixa	alta
Saturação	não	sim
Velocidade de resposta	rápida	lenta
Abilidade de adaptação à luz	ampla ⁽³⁾	limitada ⁽³⁾
Grau de adaptação ao escuro	rápido	lento
Pico de sensibilidade espectral	depende da opsina ⁽⁴⁾	~ 500 nm ⁽⁴⁾

Fonte: Joselevitch (2008), a partir de: Ebrey & Koutalos (2001); ¹Chun, Grunert, Martin & Wässle (1996); ²Migdale et al. (2003); ³Burns & Lamb (2003) e Pugh Jr. & Lamb (2000); ⁴Darnall, Bowmaker, & Mollon (1983).

Existem três tipos de cones na retina humana; cada tipo contém um fotopigmento visual específico maximamente sensível a uma determinada faixa do espectro visível: comprimentos de onda curtos (pico em ~ 420 nm); médios (pico em ~ 530 nm); e longos (pico em ~ 560 nm). O fotopigmento encontra-se no segmento externo do cone, que é mais curto que o do bastonete e com diâmetro irregular (Schnapf, Kraft, & Baylor, 1987; Nathans, Thomas, & Hogness, 1986). O terminal sináptico do cone, denominado pedículo, possui formato achatado com mais de uma invaginação (Figura 4).

A visão humana em níveis diurnos de iluminação é mediada pelos cones (visão fotópica). O sistema de cones possui alta resolução temporal, porque, entre outros processos, a molécula do pigmento visual renova-se mais rapidamente, e espacial, devido à convergência de poucos cones para um único neurônio de segunda ordem (Davson, 1980; Rodieck, 1998, Burns & Lamb, 2003). Além disso, a existência de fotopigmentos com diferentes picos de absorção é o primeiro mecanismo responsável pela visão de cores.

O sistema de bastonetes utiliza apenas um tipo de fotopigmento visual, a rodopsina, cujo pico de sensibilidade espectral ocorre em torno de 495 nm a 500 nm (Bowmaker & Dartnall, 1980). A rodopsina está localizada no segmento externo do bastonete que é alongado e possui diâmetro uniforme. O terminal sináptico do bastonete, denominado esférula, possui uma região invaginada de formato arredondado (Figura 4). Os bastonetes são responsáveis pela visão em baixos níveis de iluminação (visão escotópica) e encontram-se saturados em grande parte da faixa de intensidades luminosas que normalmente está disponível para o sistema visual. Sua maior sensibilidade em relação aos cones é devida à amplificação do sinal que ocorre durante a cascata de fototransdução. Além disso, os bastonetes possuem uma opsina mais estável e apresentam menor ruído intrínseco que os cones. Um bastonete consegue sinalizar a absorção de um único fóton (Baylor, Lamb, & Yau, 1979; Rieke & Baylor, 1998; Rieke & Baylor, 2000).

Figura 3. Representação esquemática da secção transversal do globo ocular destacando as principais estruturas (A) e representação esquemática simplificada dos principais grupos celulares da retina (B). Modificada de Kolb (2003).

Figura 4. Representação esquemática dos dois tipos de fotorreceptores presentes na camada de fotorreceptores da retina humana: cone e bastonete. O segmento externo sensível à luz compreende uma área de membrana lipídica na qual as moléculas do fotorpigmento visual encontram-se armazenadas. O segmento interno compreende as organelas celulares convencionais. Na base da célula, localiza-se o terminal sináptico, responsável pela comunicação com os neurônios segunda ordem. O caminho de circulação da corrente elétrica está representado no bastonete. Modificado de Burns & Lamb (2003).

O sistema de bastonetes possui baixa resolução temporal, devido ao tempo que a molécula do fotopigmento visual necessita para renovar-se, e baixa resolução espacial, devido à convergência de um número considerável de bastonetes para um único neurônio de segunda ordem (Davson, 1980; Rodieck, 1998, Burns & Lamb, 2003). Em níveis intermediários de intensidade luminosa, cones e bastonetes podem funcionar simultaneamente, mecanismo conhecido como visão mesópica (Buck, 2003).

Os cones e bastonetes liberam o neurotransmissor glutamato no escuro e quando há hiperpolarização devido à presença de luz, essa liberação diminui. Os neurônios que recebem os sinais dos cones e bastonetes são as células bipolares, tipo ON e OFF (Figura 5), e as células horizontais. As células horizontais são interneurônios retinianos cuja atividade é influenciada pelos sinais recebidos dos fotorreceptores e pelos sinais de retroalimentação gerados por elas próprias e enviados para os cones. Os dendritos da célula bipolar recebem a informação de cones e bastonetes e o axônio a envia para as células da retina interna. As células bipolares ON e OFF respondem ao aumento e à diminuição, respectivamente, da luminância média local em comparação à luminância geral e encaminham os sinais ON e OFF paralelamente para as células amácrinas e ganglionares da retina (Buck, 2003; Rodieck, 1998; Tessier-Lavigne, 2000).

Figura 5. Comunicação entre o cone e as células bipolares ON e OFF. A luz inicia uma série de eventos intracelulares que resultam na hiperpolarização do fotorreceptor. A diminuição na liberação de neurotransmissor pelos fotorreceptores provoca diferentes respostas nas células bipolares: i) hiperpolarização das células bipolares OFF (à esquerda) e ii) despolarização das células bipolares ON (à direita). Modificado de Tessier-Lavigne (2000).

A diferença de polaridade entre as respostas elétricas das células bipolares ON e OFF ocorre devido à presença de diferentes tipos de receptores de glutamato em seus dendritos, que ativam mecanismos iônicos pós-sinápticos diferentes. A célula bipolar ON utiliza um tipo de receptor metabotrópico de glutamato (mGluR6) que inverte a polaridade do sinal recebido dos fotorreceptores e, portanto, despolariza na presença de luz (Nakajima et al., 1993; Nomura et al., 1994; Vardi, Duvoisin, Wu, & Sterling, 2000). A célula bipolar OFF possui receptores ionotrópicos de glutamato (iGluRs). Algumas células bipolares OFF expressam os receptores AMPA e outras expressam os receptores Kainato (Nelson, Famiglietti, & Kolb, 1978; Morigiwa & Vardi, 1999). Cada tipo de receptor possui uma cinética própria, permitindo que as células bipolares OFF respondam seletivamente para componentes temporais diferentes (DeVries, 2000). As células bipolares OFF conservam a polaridade do sinal recebido dos fotorreceptores e hiperpolarizam na presença de luz (Sterling, 2003; Wilson, 2003).

A comunicação de cones e bastonetes com neurônios de segunda ordem ocorre principalmente através de dois tipos de sinapses: basal e invaginada. A sinapse basal é semelhante às sinapses de outros locais do sistema nervoso. A sinapse invaginada é mais complexa. Sinapse invaginada é aquela na qual os processos dendríticos das células bipolares e horizontais projetam-se para dentro de uma cavidade criada pela membrana pré-sináptica do fotorreceptor. A figura 6 apresenta os dois tipos de sinapses descritas para os cones: i) invaginada, na qual o elemento central é o dendrito da célula bipolar ON e os dois elementos laterais são os processos das células

horizontais; ii) basal, mostrando o contato sináptico do cone com a célula bipolar OFF (modificado de Vardi et al., 2002).

Os bastonetes apresentam sinapses invaginadas com as células bipolares ON e com as células horizontais. Nos cones a maior parte das sinapses invaginadas ocorre com as células bipolares ON e a maior parte dos contatos sinápticos basais ocorre com as células bipolares OFF (Vardi, Morigiwa, Wang, Shi, & Sterling, 1998; Morigiwa & Vardi, 1999). Entretanto, alguns autores mostraram que em primatas podem haver contatos sinápticos de células bipolares ON em regiões basais, ou seja, fora da invaginação do terminal sináptico dos cones (Calkins, Tsukamoto, & Sterling, 1996).

A distrofina foi primeiramente localizada nas regiões sinápticas da camada plexiforme externa da retina de roedores (Miike et al., 1989; Miyake et al., 1991). Posteriormente, os mesmos autores utilizaram diferentes tipos de anticorpos e observaram que a distrofina estava presente na camada plexiforme externa da retina de camundongos controles e também do modelo animal para o estudo da DMD, o camundongo mdx (*X-linked muscular dystrophy*). Os autores interpretaram o resultado sugerindo que a alteração genética deste modelo animal provavelmente não alterava a expressão de algum subproduto menor do gene da distrofina na retina (Zhao, Uchino, Yoshioka, Miyake, & Miike, 1991).

Figura 6. Representação do complexo sináptico do cone. O dendrito da célula bipolar ON forma o elemento central da tríade cujas posições laterais são ocupadas pelos processos da célula horizontal na sinapse invaginada. O dendrito da célula bipolar OFF forma a sinapse basal. Os contatos ocorrem em três regiões especializadas nas quais as membranas celulares possuem maior densidade elétrica (linhas grossas). O pedículo do cone libera glutamato para os processos das células horizontais (h) e para os dendritos das células bipolares ON e OFF através da exocitose que ocorre no sítio de liberação localizado sob a fita sináptica. O contato sináptico entre o cone e a célula horizontal ocorre na parte invaginada logo abaixo da fita sináptica. A membrana da célula horizontal expressa receptores ionotrópicos de glutamato (iGluR). A membrana da célula bipolar OFF também expressa os receptores iGluR. A membrana da célula bipolar ON expressa o receptor metabotrópico de glutamato (mGluR6) e um canal não seletivo de cátions. Modificado de Vardi et al., 2002.

A localização da distrofina na camada plexiforme externa da retina foi confirmada por outros estudos em retina de roedores (Ueda et al., 1995a; Ueda, Tsukahara, Kobayashi, & Ohno, 1995b; Kameya et al., 1997; Blank, Koulen, Blake, & Kroger, 1999), de humanos (Pillers et al., 1993), e de outros animais (Blank, Koulen, & Kroger, 1997; Blank, Blake, & Kroger, 2002; Arsanto et al., 1999; Bordaís et al., 2005). Algumas proteínas que formam o complexo de proteínas associadas à distrofina nos músculos, como por exemplo α -dístroglicano (Montanaro, Carbonetto, Campbell, & Lindenbaum, 1995), β -dístroglicano (Montanaro et al., 1995; Drenckhahn et al., 1996; Kameya et al., 1997; Ueda, Gohdo, & Ohno, 1998; Koulen, Blank, & Kroger, 1998) e as dístrobrevinas (Ueda et al., 2000a) também foram identificadas na camada plexiforme externa da retina (Dallos et al., 2003; Kameya et al., 1997).

Não há consenso na literatura quanto à localização pré- ou pós-sináptica do complexo de proteínas associadas à distrofina. Há evidência de que as proteínas α - e β -dístroglicanos assim como a distrofina encontram-se associadas aos dendritos das células bipolares e horizontais no lado pós-sináptico (Schmitz, Holbach, & Drenckhahn 1993; Drenckhahn et al., 1996), assim como ocorre em neurônios cerebrais (Lidov et al., 1990). Entretanto, os trabalhos que mostraram a expressão da distrofina (Claudepierre et al., 1999), α - e β -dístroglicanos (Montanaro et al., 1995) e dístrobrevinas (Ueda et al., 2000a) pelos fotorreceptores, sugerem uma localização pré-sináptica da distrofina (Blank et al., 1997; 1999; Jastrow, Koulen, Altrock, & Kroger, 2006). Além disso, o padrão de distribuição dos receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR6) nas células bipolares ON não é alterado pela disfunção da distrofina na retina (Kameya et al., 1997), sugerindo que o complexo de

proteínas associadas à distrofina estaria localizado no lado pré-sináptico da camada plexiforme externa da retina. Outros autores, que estudaram a retina suína, defendem a hipótese de localização pré- e pós-sináptica da distrofina na camada plexiforme externa da retina (Bordais, Varela, Fort, Sahel, & Rendon, 2004; Bordais et al., 2005). É provável que existam diferenças na localização pré- e/ou pós-sináptica dependendo da espécie estudada. A figura 7 mostra, como exemplo, o desenho do complexo de proteínas associadas à distrofina na sinapse invaginada de um bastonete (Schmitz & Drenckhahn, 1997a e b; Jastrow et al., 2006).

Pillers et al. (1993) mostraram pela primeira vez que diferentes isoformas da distrofina estariam presentes na camada plexiforme externa da retina humana. Posteriormente, foram identificadas na retina de roedores, através do método *western blot*, diferentes isoformas da distrofina (Claudepierre et al., 1999; Blank et al., 1999; Wersinger et al., 2011). Entretanto, somente a Dp260 apresentou aumento rápido no nível de expressão durante o desenvolvimento retiniano com padrão semelhante de expressão ao do receptor metabotrópico das células bipolares ON, o mGluR6 (Rodius et al., 1997). De fato, a Dp260 é necessária para a transmissão normal dos sinais de cones e bastonetes para as células bipolares (Cibis et al., 1993; Pillers, 1999) e parece compensar a ausência da Dp427 na retina do camundongo mdx que não apresenta alteração na estrutura morfológica do complexo sináptico e nem na atividade eletrofisiológica da retina (Schmitz & Drenckhahn, 1997a).

Figura 7. Representação da localização da distrofina e dos distroglicanos na invaginação do complexo sináptico do bastonete. B = dendrito da célula bipolar e H = processo da célula horizontal. Modificado de Schmitz & Drenckhahn (1997a, b).

.A distrofina completa (Dp427) é expressa pelas células bipolares dos bastonetes e pelos fotorreceptores da retina externa, especialmente pelos cones. A Dp140 também está localizada na camada plexiforme externa da retina de camundongos. Entretanto, a Dp260 é a isoforma da distrofina encontrada em maior quantidade na retina, principalmente no terminal sináptico dos bastonetes. Há ainda evidência de que a Dp427 seria expressa na camada nuclear interna por interneurônios retinianos, as células amácrinas, ou pelas células bipolares OFF (Wersinger et al., 2011). O papel das células amácrinas nos circuitos retinianos será discutido adiante.

1.2.2 A distrofina expressa pelas células gliais da retina

Apesar da grande concentração de distrofina na camada plexiforme externa da retina (Schmitz & Drenckhahn, 1997a e b), a proteína também é expressa pelas células de Müller da retina (Austin, Howard, D'Souza, Klamut, & Ray, 1995; Blank et al., 1997; Howard et al., 1998; Claudepierre et al., 1999; Dalloz et al., 2003; Fort et al., 2008) e pelos astrócitos perivasculares (Dupas et al., 2008; Pillers et al., 1999b). As células de Müller são as principais células gliais da retina. Elas possuem importante função estrutural porque enviam processos para a membrana limitante externa e interna da retina. Além disso, as células de Müller estão envolvidas no transporte retiniano de água e no equilíbrio do nível iônico extracelular que é constantemente modificado pela atividade dos neurônios retinianos. Para desempenhar essas funções, a célula de Müller utiliza os canais AQP4 e Kir4.1, respectivamente, localizados na membrana celular (Newman, 1984; Newman, Frambach, & Odette, 1984).

A distrofina associada à membrana plasmática das células de Müller, localizada na membrana limitante interna da retina, é a isoforma menor, a Dp71 (Montanaro et al., 1995; Drenckhahn et al., 1996; Schmitz & Drenckhahn, 1997a; Ueda et al., 1998). Além da Dp71, alguns componentes que formam o complexo de proteínas associadas à distrofina (α - e β -dystroglicanos, dystrobrevinas, sarcoglicanos e sintrofina) também estão presentes na membrana limitante interna da retina (Blank et al., 1997; Claudepierre et al., 2000a e b; Moukhles, Roque, & Carbonetto, 2000; Ueda et al., 2000a; Dalloz et al., 2001; 2003; Puwarawuttipanit et al., 2006; Fort et al., 2008).

Acredita-se que o complexo de proteínas no qual a distrofina está inserida seja responsável pela ligação entre a matriz extracelular da membrana limitante interna da retina e o citoesqueleto da célula de Müller, semelhante à estrutura formada pela distrofina no tecido muscular. O complexo também é necessário para a adesão das células de Müller ao humor vítreo, garantindo a manutenção da estrutura retiniana (Schmitz & Drenckhahn, 1997a e b; Howard et al., 1998; Blank et al., 2002). A Dp71 e as outras proteínas a ela associadas, garantem a distribuição apropriada de canais AQP4 e Kir4.1 na membrana das células de Müller (Fort et al., 2004). Connors & Kofuji (2002) realizaram experimentos com imunistoquímica e eletrofisiologia e encontraram maior concentração desses canais em regiões onde a Dp71 e o complexo de proteínas associadas se localizam. A distrofina expressa nos astrócitos, outro tipo de célula glial da retina, está em contato com os vasos sanguíneos e tem função importante na formação e na manutenção da barreira entre os vasos sanguíneos e a retina. Nesse caso, a ausência da Dp71 poderia alterar a regulação da permeabilidade vascular retiniana (Sene et al., 1999).

Há evidência de um mecanismo compensatório que ocorre na ausência da Dp71 na retina. A proteína utrofina, cujo gene em humanos localiza-se no braço longo do cromossomo 6 (região 6q24), também foi localizada na retina. Ela possui 80% da sequência de aminoácidos da distrofina (Montanaro et al., 1995) e, assim como a Dp71, pode ligar-se ao complexo de glicoproteínas (Ahn & Kunkel, 1993). A utrofina parece compensar parcialmente a função da Dp71 na distribuição do canal Kir4.1 na membrana do terminal das células de Müller (Puwarawuttipanit et al., 2006; Fort et al., 2008). O camundongo que não possui a isoforma Dp71 (em inglês: *Dp71-null mice*), apresenta aumento da

proteína utrofina na membrana limitante interna da retina em comparação ao camundongo controle. Além disso, a alteração exclusiva da Dp71 não altera o ERG deste modelo animal (Daloz et al., 2003; Cia et al., 2010).

1.2.3 Circuitos retinianos

Na retina há dois fluxos de informação visual: i) a via vertical, formada por cones e bastonetes, células bipolares e células ganglionares, que é a principal e ii) vias laterais secundárias que compreendem circuitos locais de retroalimentação formados pelas células horizontais e células amácrinas (para revisão: Joselevitch, 2008). Ambas as vias participam do processamento da informação visual nos diversos níveis de iluminação do ambiente. Entretanto, a via dos cones e a via dos bastonetes utilizam diferentes circuitos retinianos (Boycott & Wässle, 1991). No sistema de cones, as projeções para as células ganglionares ocorrem através das células bipolares ON e OFF, enquanto o sistema de bastonetes utiliza, principalmente, as células bipolares ON (Kolb & Famiglietti, 1974).

A comunicação entre bastonetes e células ganglionares ocorre através de circuitos indiretos, principalmente, e um circuito direto. Cada circuito da via dos bastonetes está predominantemente ligado a uma faixa de intensidades de luz diferente, estendendo a faixa dinâmica dos bastonetes (Volgyi, Deans, Paul, & Bloomfield, 2004). Uma particularidade do circuito indireto dos bastonetes, que funciona em baixos níveis de intensidade de luz, é a comunicação com as células amácrinas através de junções elétricas que permitem a sincronização do sinal (Vardi & Smith, 1996; Deans, Volgyi, Goodenough, Bloomfield, & Paul,

2002; Völgyi et al., 2004). Dessa maneira, as células ganglionares podem ser ativadas pelo sinal de um único bastonete (Barlow, Levick, & Yoon, 1971).

A Figura 8 apresenta os três circuitos de bastonetes descritos até o momento. No circuito primário (Figura 8A), as células bipolares de bastonetes (tipo ON ou despolarizantes) projetam-se para as células amácrinas tipo All. As células amácrinas All fazem sinapses elétricas com as células bipolares ON da via dos cones e sinapses químicas inibitórias com as células bipolares OFF da via dos cones. Em seguida, as células bipolares ON e OFF da via dos cones enviam os sinais para as células ganglionares ON e OFF, respectivamente (Famiglietti & Kolb, 1975). Este circuito primário dos bastonetes, que interliga as células bipolares ON com a via dos cones através das células amácrinas All, é responsável pelo processamento visual de alta sensibilidade, ou seja, com o sistema visual adaptado ao escuro (Völgyi et al. 2004).

No circuito secundário (Figura 8B), os sinais mediados pelos bastonetes são encaminhados diretamente para os cones através das junções elétricas formadas entre as esférulas e os pedículos. Em seguida, os sinais dos bastonetes são enviados para as células bipolares ON e OFF da via dos cones que encaminham os sinais para as células ganglionares ON e OFF, respectivamente, na retina interna (Raviola & Gilula, 1973). Esse circuito secundário, que utiliza as junções elétricas entre bastonetes e cones, é menos sensível que o anterior, e é responsável pelo processamento da visão em níveis intermediários de intensidade luminosa com o sistema visual adaptado ao escuro (Völgyi et al. 2004).

No circuito terciário (Figura 8C), os sinais provenientes dos bastonetes são transmitidos através de sinapses químicas excitatórias diretamente a um

tipo de célula bipolar OFF da via dos cones e desta às células ganglionares OFF (Hack, Peichl, & Brandstätter, 1999). Estudos mostram que em camundongos, esse terceiro circuito, menos sensível, é ativado em níveis mais altos de intensidade luminosa que os níveis que ativam os dois circuitos anteriores (Deans et al., 2002; Völgyi et al., 2004).

Os circuitos dos bastonetes, assim como o circuito dos cones, enviam os sinais para as células ganglionares da retina. A maioria das células ganglionares da retina apresenta campos receptivos antagonistas. A célula ganglionar centro-ON responde com ativação quando recebe um sinal luminoso no centro do seu campo receptivo e inibição quando recebe um sinal luminoso na periferia do seu campo receptivo. Ao contrário, a célula ganglionar centro-OFF responde com inibição quando recebe um sinal luminoso no centro do seu campo receptivo e ativação quando recebe um sinal luminoso na periferia do seu campo receptivo (Hartline, 1940; Kuffler, 1958; Hartline, 1969).

Os diferentes tipos de células ganglionares da retina, por exemplo, as células magno (M) e as células parvo (P), variam em forma, tipo de comunicação, na distribuição espacial e na contribuição para o processamento da informação visual (para revisão: Field & Chichilnisky, 2007), entretanto todos os tipos possuem como característica principal o envio de sinais visuais para o cérebro sob a forma de potenciais de ação (Hartline, 1969).

Figura 8. Representação dos circuitos retinianos. Asteriscos = sinapse elétrica; setas = sinapse química; área sombreada = elementos da via do bastonete. Na via primária (A) os sinais dos bastonetes são enviados para as células bipolares ON de bastonetes (RB) e destas para as células amácrinas AII. As células amácrinas AII enviam os sinais através de junções elétricas para o terminal axônico da célula bipolar (CB) ON de cones, conservando o sinal, e para o terminal axônico da célula bipolar OFF dos cones, invertendo o sinal através de sinapses químicas. Finalmente, as células bipolares ON e OFF dos cones enviam os sinais dos bastonetes para as células ganglionares (GC) ON e OFF, respectivamente. Na via secundária (B), os sinais são enviados diretamente dos bastonetes para os cones através de junções elétricas e encaminhados para as células bipolares ON e OFF dos cones que, por sua vez, encaminham os sinais para as células ganglionares ON e OFF na retina interna. Na via terciária (C), os bastonetes fazem sinapses químicas (cujo sinal é conservado) diretamente com as células bipolares OFF dos cones que, por sua vez, transmitem os sinais para as células ganglionares OFF. A seta grande indica a sinapse química direta entre os bastonetes e a célula bipolar OFF. Modificada de Völgyi et al. (2004).

1.2.4 O ERG na DMD

Quando a luz atravessa a pupila e alcança a retina, sinais elétricos, iniciados pelos fotorreceptores, são gerados devido à atividade de diferentes grupos celulares. Os sinais elétricos podem variar conforme a adaptação do sistema visual e as características temporais, espectrais e de luminância da luz (Perlman, 1995). Esses sinais podem ser registrados de maneira não invasiva através de um eletrodo posicionado próximo da córnea ou na própria superfície corneana. O registro do potencial elétrico de massa iniciado pelos fotorreceptores e gerado pela atividade dos diversos grupos celulares da retina em resposta a um estímulo luminoso é o eletrorretinograma (ERG) (Granit, 1933). O ERG pode ser utilizado para estudar a fisiologia ou para avaliar disfunções retinianas que, em alguns casos, não alteram a anatomia da retina, nos quais, portanto, o exame de fundo de olho é considerado normal (Armington, 1974).

A Sociedade Internacional de Eletrofisiologia Visual Clínica (em inglês ISCEV, *International Society for Clinical Electrophysiology of Vision*) estabelece parâmetros para procedimentos de avaliação visual eletrofisiológica que são periodicamente atualizados. Os parâmetros, tanto de estimulação como de análise dos resultados, são determinados de modo a avaliar diferentes aspectos fisiológicos da retina (Marmor & Zrenner, 1999; Marmor, Holder, Seelinger, & Yamamoto, 2004; Marmor et al., 2009).

Figura 9. Exemplos de ERGs escotópico (adaptado ao escuro) e fotópico (adaptado ao claro) cujos parâmetros de estimulação são padronizados e periodicamente revisados pela ISCEV. As setas indicam o momento em que o estímulo luminoso ocorreu, neste caso um flash de luz. Modificada de Marmor et al. (2009).

Uma das metodologias frequentemente utilizada para a medida eletrorretinográfica é o ERG de campo total cujo estímulo luminoso atinge regiões centrais e periféricas da retina. As respostas eletrorretinográficas geradas pela estimulação por flashes de luz apresentam uma onda complexa, com diferentes componentes, por exemplo, onda-a, onda-b, onda-c e onda-d (Frishman, 2006). Além disso, é possível avaliar as respostas iniciadas pelos bastonetes ou pelos cones (Berson, Gouras, & Gunkel, 1968; Berson, Gouras, Gunkel, & Myrianthopoulos, 1969). A figura 9 apresenta exemplos de respostas de protocolos padronizados pela ISCEV para o ERG de campo total geradas pela apresentação de flashes de luz com o sistema visual adaptado ao escuro (ERG escotópico) e com o sistema visual adaptado ao claro (ERG fotópico), respectivamente.

Após o achado de ausência da onda-b do ERG escotópico (Pillers et al., 1990a; 1990b) em um jovem com diversas alterações genéticas entre elas a DMD, Pillers et al. (1993) avaliaram seis jovens com diagnóstico de DMD e encontraram redução da onda-b do ERG escotópico em todos os jovens avaliados. Na mesma época, Cibis et al. (1993) mostraram redução na amplitude da onda-b do ERG escotópico de cinco jovens com DMD. No mesmo estudo, os autores mostraram que o camundongo mdx não apresentava a alteração no ERG encontrada em humanos. Entretanto, este modelo animal apresenta mutação genética no exon 23 do gene da DMD (Sicinski et al., 1989) e, nesse caso, somente a expressão da distrofina completa (Dp427) encontra-se alterada (Hoffman et al., 1987b).

Cibis et al. (1993) apresentaram as seguintes conclusões: i) a redução da onda-b do ERG escotópico em jovens com DMD seria causada pela alteração na transmissão sináptica entre os bastonetes e as células bipolares; e ii) a alteração na expressão da proteína completa (Dp427) não seria suficiente para alterar o ERG no camundongo mdx. Posteriormente, Fitzgerald et al. (1994) avaliaram o ERG de campo total em 11 jovens com DMD (Figura 10) e incluíram um protocolo fotópico de flash de longa duração. Os jovens apresentaram redução da amplitude da onda-b do ERG escotópico, como descrito anteriormente, e redução da amplitude da onda-b do ERG fotópico com flash de longa duração. Esse perfil de respostas do ERG pode ser observado quando há bloqueio farmacológico dos receptores das células bipolares despolarizantes na retina de primatas, ou seja, quando há alteração na comunicação sináptica entre os fotorreceptores e as células bipolares ON (Sieving, 1993).

Para avaliação das vias visuais ON e OFF através do ERG de campo total, não há, atualmente, protocolos recomendados pela ISCEV. Entretanto o protocolo fotópico que utiliza um estímulo com flash de longa duração (~200 ms) é considerado pela ISCEV um tipo especializado de ERG de campo total para avaliação da atividade das vias ON e OFF dos cones (Marmor et al., 2004; 2009). Este protocolo é normalmente utilizado para separar os componentes do ERG de campo total fotópico gerados pelo aumento rápido da luminância, que estimularia preferencialmente a via ON dos cones, seguido pela diminuição rápida da luminância após ~200 ms, que estimularia preferencialmente a via OFF dos cones (Sieving, 1993; Sustar, Hawlina, & Breclj, 2006). Alguns trabalhos mostraram a eficiência do protocolo do ERG fotópico com flash de longa duração ao encontrarem perdas seletivas para a via ON em distrofias retinianas (Sieving, 1993), na CSNB e na própria DMD (Fitzgerald et al., 1994).

Outra alternativa que permite avaliar a atividade das vias ON e OFF dos cones é o protocolo de estimulação intermitente (flicker) com modulação da luminância em dente de serra (Kremers, Lee, Pokorny, & Smith, 1993). A Figura 11 mostra que o protocolo rápido-ON consiste no aumento rápido seguido pela diminuição linear da luminância do estímulo para enfatizar a resposta ON. O protocolo rápido-OFF consiste na diminuição rápida seguida pelo aumento linear da luminância do estímulo para enfatizar a resposta OFF.

Figura 10. Respostas do ERG escotópico (esquerda) e do ERG fotópico com flash de longa duração (direita) de controles e jovens com DMD. Observe que nesse estudo a duração do flash foi 80 ms. Jovens com DMD apresentam amplitude normal da onda-a e redução da amplitude da onda-b do ERG escotópico e do ERG fotópico com flash de longa duração. Fonte: Schmitz & Drenckhahn (1997a), a partir de Fitzgerald et al. (1994).

Figura 11. Ilustração de modulação temporal a 4 Hz da luminância do estímulo intermitente em dente de serra: rápido-ON (acima) e rápido-OFF (abaixo). Linhas pontilhadas: luminância média.

O protocolo do flash fotópico de longa duração foi avaliado em jovens com DMD por Fitzgerald et al. (1994), como mostrado anteriormente, entretanto não foram encontrados estudos de avaliação do ERG de campo total com estimulação em dente de serra em jovens com DMD.

As alterações do ERG escotópico encontradas em jovens com DMD parecem não ocorrer devido à disfunção da distrofina completa, a proteína que causa as alterações musculares (Dp427), porque nesse caso todos os jovens com DMD apresentariam alterações semelhantes. Pelo mesmo motivo, o modelo animal da DMD, o camundongo mdx, também apresentaria o ERG escotópico alterado devido à ausência da Dp427, entretanto isso não ocorre (Pillers et al., 1999b).

Para investigar essa hipótese, o ERG foi avaliado na variante do modelo animal original da DMD, o camundongo mdx^{3Cv}, que apresenta um tipo de mutação genética (exon 65) capaz de alterar não somente a expressão da Dp427 como também a expressão das isoformas menores da distrofina (Cox, Phelps, Chapman, & Chamberlain, 1993). O novo modelo animal apresentou alterações no ERG semelhantes às previamente encontradas em jovens com DMD (Pillers et al., 1995; Varela-Rodríguez, Felipe, Picaud, Sahel, & Rendon, 2006). Outros modelos animais da DMD, como o camundongo mdx^{2Cv} (com deficiência das isoformas Dp427 e Dp260) e o camundongo mdx^{4Cv} (com deficiência das isoformas Dp427, Dp260 e Dp140), expressam a isoforma Dp71. Esses dois modelos animais apresentaram redução da amplitude e atraso no tempo implícito da onda-b do ERG escotópico (Kameya et al. 1997; Pillers et al., 1999a). O camundongo que possui apenas a isoforma Dp71

alterada (*Dp71-null mice*) foi avaliado e apresentou o ERG normal (Dalloz et al., 2003).

Esses resultados corroboram a segunda conclusão de Cibis et al. (1993), mostrando que o local da alteração genética deve estar relacionado com a severidade do fenótipo visual (DeBecker et al., 1994; Pillers et al., 1995; 1999b; Jensen et al., 1995; Drenckhahn et al., 1996; Rodius et al., 1997; Kameya et al., 1997). Em resumo, a maioria dos autores sugere que as diferentes isoformas da distrofina encontradas na retina, contribuem de maneira distinta para a eletrofisiologia retiniana (Ino-ue et al., 1997; Howard et al., 1998; Dalloz et al., 2003; Claudepierre et al., 2000b).

1.2.5 Via retino-geniculo-cortical e o potencial cortical visual provocado em jovens com DMD

Após o processamento retiniano da informação visual, os sinais neurais são enviados para o cérebro através do nervo óptico, formado pelos axônios das células ganglionares. Os tipos mais comuns de células ganglionares da retina são as células magno (M), as células parvo (P) e as células konio (K) que possuem diferenças morfológicas e funcionais e, portanto, contribuem para diferentes aspectos do processamento da informação visual (Shapley & Perry, 1986). As células M possuem campos receptivos maiores e axônios que permitem rápida velocidade de condução da informação retiniana para o cérebro. As células P possuem campos receptivos menores e axônios que enviam a informação visual da retina para o cérebro mais lentamente em comparação às células ganglionares M (Silveira et al., 2004). As características

morfológicas e funcionais das células K são heterogêneas porque esse grupo compreende diversos tipos celulares (Hendry & Reid, 2000).

No cérebro, a informação visual é processada, primeiramente, pelos neurônios do núcleo geniculado lateral (NGL) na região dorsal do tálamo. As propriedades dos campos receptivos dos neurônios do NGL são semelhantes às propriedades dos campos receptivos das células ganglionares da retina. As fibras das células ganglionares M são projetadas para as camadas magnocelulares (ventrais) do NGL, as fibras das células ganglionares P são projetadas para as camadas parvocelulares (dorsais) do NGL (Silveira & De Mello Jr., 1998) e as fibras das células ganglionares K são projetadas para as camadas koniocelulares do NGL (Dacey & Parker, 2003). Além disso, a maioria dos neurônios do NGL possui campos receptivos com organização centro-periferia. Dessa maneira, os sinais visuais ON e OFF iniciados na retina permanecem preservados nessa fase do processamento visual (Wiesel & Hubel, 1966; Schiller, 1984).

Os axônios de neurônios do NGL projetam-se, principalmente, para o córtex visual primário (V1) cujos neurônios organizam-se em camadas, como os neurônios do NGL, e em colunas (Hubel & Wiesel, 1968; 1974). Os neurônios do NGL projetam-se para diferentes camadas em V1: a camada 4C α é o principal alvo das células M e a camada 4C β é o principal alvo das células P do NGL (Blasdel & Lund, 1983). No córtex visual primário, alguns neurônios possuem campos receptivos circulares, semelhantes aos campos receptivos dos neurônios do NGL e das células ganglionares da retina e, portanto, apresentam seletividade para o processamento dos sinais visuais ON e OFF

iniciados na retina e encaminhados para V1 através do NGL (Hubel & Wiesel, 1968).

Os potenciais elétricos corticais originados em resposta à luz por neurônios localizados em V1 podem ser registrados de forma não invasiva através de diferentes protocolos de medida do potencial cortical visual provocado (PCVP). Girlanda et al. (1997) estudaram o PCVP de padrão em jovens com DMD, portadoras assintomáticas da DMD e controles. Os autores não encontraram diferenças entre os três grupos. Posteriormente, alguns jovens com DMD, apresentando deficiência da isoforma retiniana da distrofina (Dp260), foram estudados por Benoff et al. (2001). Os autores utilizaram o PCVP de varredura com estímulos em forma de tabuleiro de xadrez apresentando contraste positivo (quadrados brancos sobre fundo cinza) e contraste negativo (quadrados pretos sobre fundo cinza) e consideraram que o primeiro estaria estimulando a atividade da via visual ON e o segundo estaria estimulando a atividade da via visual OFF. Os resultados mostraram alteração da resposta cortical para o contraste positivo nas frequências espaciais intermediárias e contrastes baixos, sugerindo prejuízo na via magnocelular ON (Benoff et al., 2001). Em resumo, o estudo mostrou que os prejuízos visuais causados pela alteração da distrofina na retina de jovens com DMD resultam em perdas corticais seletivas na via visual ON.

1.2.6 Alterações em funções visuais causadas pela DMD

Apesar de estabelecido na literatura que a acuidade visual não é afetada pela DMD (Sigesmund et al., 1994; Debecker et al., 1994; Costa et al., 2004; 2005; 2007b), poucos estudos avaliaram outras funções visuais nessa população.

Inicialmente, a visão de cores em jovens com DMD foi estudada por Philips, Walton, & Smith (1956). Os autores avaliaram o desempenho no teste de pranchas de Ishihara de uma família com 20 sujeitos, entre eles jovens com DMD e portadoras assintomáticas da DMD. Os resultados mostraram que 25% da população carregava simultaneamente os dois fenótipos: DMD e de alteração na visão de cores. Trabalhos posteriores mostraram que o gene da DMD e o gene envolvido na alteração da visão de cores encontram-se em locais distintos no cromossomo X (Emery, 1966; Zatz, Itskan, Sanger, Frola-Pessoa, & Saldanha, 1974; Greig, 1977).

Recentemente, Costa et al. (2007b) examinaram a visão de cores de jovens com DMD usando testes visuais computadorizados, mais sensíveis, e encontraram prejuízos na discriminação cromática para o eixo verde-vermelho em jovens com DMD com alterações genéticas posteriores ao exon 30 (*downstream* 30), ou seja, com a expressão da isoforma retiniana (Dp260) alterada. Além disso, prejuízos na sensibilidade ao contraste espacial de luminância e cromática e na sensibilidade ao contraste temporal de luminância no mesmo grupo de pacientes (Costa et al., 2011) confirmaram a hipótese de envolvimento da Dp260 nas alterações de funções visuais causadas em jovens com DMD (Costa, 2004).

1.3 Justificativa

A contribuição das pesquisas básicas, que utilizam modelos animais para o avanço no entendimento dos aspectos morfológicos e funcionais do processamento visual, associada às novas tecnologias para investigação clínica não invasiva do processamento da informação visual em condições fisiológicas ou alteradas por doenças, permite o avanço das ciências visuais. O presente trabalho foi proposto considerando estudos com modelos animais que mostraram comprometimentos retinianos causados pela disfunção da proteína distrofina (Cibis et al., 1993; Pillers et al., 1995; Drenckhahn et al., 1996; Schmitz. & Drenckhahn, 1997a) e considerando as pesquisas clínicas que mostraram alterações das respostas eletrofisiológicas visuais (Cibis et al., 1993; Pillers et al., 1993; Fitzgerald et al., 1994; Girlanda et al., 1997; Pascual-Pascual et al., 1998; Debecker et al., 1994), assim como perdas seletivas da visão de cores em jovens com DMD (Costa et al., 2007b), uma vez que frequentemente a alteração visual está relacionada com a expressão da isoforma retiniana da distrofina.

A avaliação de respostas eletrofisiológicas e psicofísicas pode contribuir para o melhor entendimento de prejuízos no funcionamento de diferentes mecanismos neurais na visão humana. O estudo das respostas elétricas da retina, assim como de funções visuais, em jovens com DMD oferece uma condição única para o estudo das funções da distrofina no sistema nervoso humano. É especialmente relevante o fato de podermos atualmente obter respostas que representam preferencialmente a atividade de um determinado mecanismo neural da visão e assim estudar possíveis prejuízos seletivos.

Os resultados do ERG em jovens com DMD poderão contribuir para melhor entender em quais aspectos da visão humana a distrofina estaria atuando e, dessa maneira, verificar os mecanismos visuais afetados pela doença. Por outro lado, a avaliação visual utilizando testes psicofísicos que investigam outras funções, pode revelar perdas visuais não detectadas quando é apenas medida a acuidade visual. Estas medidas podem fornecer informações mais completas sobre os possíveis prejuízos causados pela disfunção da distrofina no sistema visual e, dessa maneira, melhor caracterizar a visão dos jovens com DMD.

2. Objetivo geral

Avaliar as vias visuais ON e OFF de jovens com DMD através de testes eletrofisiológicos e psicofísicos.

2.1 Objetivos específicos

1. Estudar as respostas do ERG de campo total na DMD para verificar se o envolvimento da distrofina na comunicação entre fotorreceptores e neurônios de segunda ordem estaria afetando, preferencialmente, a via ON.
2. Avaliar a sensibilidade visual para contraste positivo e negativo para verificar se as alterações retinianas encontradas na DMD provocam prejuízos na visão, preferencialmente, relacionados com a via ON.

3. Materiais e métodos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (Anexo A) em 06 de outubro de 2006 (Registro CEP-HU/USP: 642/06). Os termos de consentimento livres e esclarecidos (Anexos B e C) foram aprovados pelo CEP-HU/USP.

Todos os participantes (ou seus respectivos responsáveis legais) estavam cientes do estudo e aceitaram assinar o termo de consentimento livre e esclarecido autorizando a sua participação (ou a participação de seu filho) na pesquisa antes do início dos testes.

3.1 Participantes

Foram convidados 40 jovens com DMD acompanhados pela Associação Brasileira de Distrofia Muscular (ABDIM) ou pela Organização de Apoio aos Portadores de Distrofias (OAPD). Aceitaram participar 26 pacientes, todos do sexo masculino, com diagnóstico de DMD. Quatro jovens (15% dos jovens que aceitaram participar) precisaram ser excluídos do estudo após o exame oftalmológico por apresentarem catarata subcapsular com acometimento do eixo visual em ambos os olhos. Outros três não puderam ser incluídos no estudo: um porque se recusou a realizar as avaliações após o exame oftalmológico, outro realizou as avaliações visuais, mas não aceitou realizar a avaliação genética e o terceiro apresentou alteração genética não detectável ao exame de DNA, provavelmente porque possui uma mutação de ponto.

O grupo incluído no estudo foi composto por 19 jovens com DMD com idades entre 11 e 23 anos (média = $15,2 \pm 3,4$ anos). Todos realizaram a avaliação psicofísica, mas apenas 10 realizaram a avaliação eletrofisiológica, devido ao curto período no qual o equipamento para registro do ERG esteve acessível para esse estudo.

A Tabela 2 apresenta a idade, o resultado do exame de DNA, o quociente de inteligência (QI; Zachi, 2009), o tempo de uso de corticóide e a acuidade visual (AV) de cada participante. O estudo foi realizado sem o conhecimento prévio dos resultados do exame de DNA. Esse foi fornecido ao final da pesquisa pela equipe de geneticistas do Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB/USP).

Os voluntários saudáveis formaram dois grupos controles distintos, um para a avaliação eletrofisiológica e outro para a avaliação psicofísica. Ambos os grupos controles foram pareados por idade com o grupo de jovens com DMD. O grupo controle para a avaliação eletrofisiológica foi composto por 30 sujeitos (16 sujeitos do sexo masculino) com idades entre 8 e 29 anos (média = $20,3 \pm 7$ anos). O grupo controle para a avaliação psicofísica foi composto por 40 sujeitos (21 sujeitos do sexo masculino) com idades entre 6 e 28 anos (idade média = $18,2 \pm 8$ anos). Ambos os grupos foram compostos por alunos da Escola de Aplicação e alunos de graduação e pós-graduação da USP.

As avaliações foram realizadas no Laboratório da Visão – Eletrofisiologia e Psicofísica Visual Clínica do Departamento de Psicologia Experimental da Universidade de São Paulo. Trata-se de um estudo prospectivo transversal controlado.

Tabela 2. Idades e resultados dos testes de DNA, QI e AV dos 19 jovens com DMD que foram incluídos do estudo.

ID	Idade	DNA	Tipo	QI	Corticóide	Acuidade Visual		Olho avaliado	ERG
						OD	OE		
1	12	3-7	duplicação	91	6	20/20	20/20	OD	Sim
2	13	3-7	duplicação	---	3	20/16	20/16	OD	Sim
3	23	46-55	deleção	89	12	20/20	20/16	OE	Sim
4	14	47-52	deleção	93	3	20/20	20/20	OD	Sim
5	16	43	deleção	88	5	20/20	20/20	OE	Sim
6	19	51	deleção	94	8	20/20	20/20	OD	Não
7	14	45	deleção	101	7	20/20	20/20	OE	Não
8	11	47-48	deleção	---	1	20/20	20/25	OD	Sim
9	11	45-52	deleção	---	2	20/20	20/20	OE	Sim
10	20	43-45	deleção	77	8	20/20	20/20	OE	Sim
11	19	50	deleção	67	15	20/25	20/20	OE	Sim
12	19	45-52	deleção	58	5	20/40	20/30	OE	Sim
13	14	44-47	deleção	59	3	20/25	20/25	OE	Não
14	17	46-49	duplicação	50	4	20/40	20/20	OE	Não
15	15	47-51	deleção	85	5	20/20	20/20	OD	Não
16	12	55	mutação de ponto	73	6	20/20	20/20	OD	Não
17	12	46-49	duplicação	---	5	20/20	20/20	OD	Não
18	14	55	mutação de ponto	---	7	20/25	20/20	OE	Não
19	13	51-52	deleção	---	6	20/16	20/16	OD	Não
Média	15,2			78,8	5,8				
DP	3,4			16,2	3,5				

ID = número de identificação; DNA = resultado do exame de DNA e o respectivo tipo de alteração genética, os números representam os exons alterados; QI = quociente de inteligência, observe que seis jovens não realizaram essa avaliação; Corticóide = tempo de uso de corticóides (em anos); OD = olho direito; OE = olho esquerdo; ERG = eletrorretinograma. Sim e Não – respectivamente, participantes que realizaram ou não realizaram o ERG; DP = desvio padrão.

Os critérios de inclusão no estudo foram: acuidade visual de Snellen corrigida 20/30 ou melhor, ausência de doenças oftalmológicas e ausência de qualquer outra doença que pudesse comprometer os resultados dos testes. O teste de visão de cores CCT (*Cambridge Colour Test*, Cambridge Research Systems, Rochester, Reino Unido) foi utilizado para verificar possíveis defeitos congênitos da visão de cores dos controles. O olho de melhor acuidade visual foi escolhido para a avaliação. No caso de haver acuidade visual igual em ambos os olhos, um dos olhos foi escolhido aleatoriamente para ser avaliado.

3.2 Avaliação Eletrofisiológica – ERG de Campo Total

Equipamento

A avaliação eletrofisiológica foi realizada utilizando-se o sistema *RETIport* composto por amplificador e sistema computadorizado de aquisição e processamento de sinais, acoplado a um estimulador de campo total (*Super Color Ganzfeld Q450 SC*; Roland Consult, Brandenburg, Alemanha) (Figura 12). O estimulador é equipado por seis conjuntos de diodos emissores de luz (em inglês, LEDs) cada um dos quais possui uma distribuição espectral diferente. No presente estudo somente o conjunto dos LEDs brancos foi utilizado. As coordenadas de cromaticidade para esse conjunto de LEDs são $x = 0,37$ e $y = 0,42$ (CIE 1931) e a sua radiância espectral para diferentes níveis de luminância está apresentada na Figura 13.

O sinal adquirido através do pré-amplificador e digitalizado por uma placa A/D (Roland Consult, Brandenburg, Alemanha), foi importado para o programa Excel e ali analisado. A frequência de corte baixa foi fixada em 1 Hz e a alta em 300 Hz. O tempo de amostragem foi de 512 ms ou 1024 ms, dependendo do protocolo.

Figura 12. Foto do sistema *RETiport* (Roland Consult, Brandenburg, Alemanha) utilizado para a avaliação eletrofisiológica, mostrando monitor de vídeo, amplificadores e estimulador de campo total ou *Ganzfeld*.

Figura 13. Radiância espectral do conjunto de LEDs brancos. Medidas obtidas com espectrorradiômetro modelo CS-1000 (Konica Minolta, Tokyo, Japan).

Preparação para a eletrorretinografia

O registro do ERG foi realizado após a dilatação da pupila (diâmetro pupilar mínimo de 7 mm) com uma gota do colírio tropicamina 1% (mydriacyl, Alcon Laboratórios do Brasil LTDA). Durante 30 minutos, após aplicação do colírio, o sujeito foi mantido em sala totalmente escurecida. A única fonte de iluminação foi uma lanterna com LED vermelho, com pico de comprimento de onda em 620 nm para evitar estimulação dos bastonetes. A lanterna foi utilizada pelo examinador durante a preparação do exame.

Dois eletrodos de ouro para eletroencefalograma (EEG) (*Gold cup*, Grass Technologies) foram utilizados como eletrodos terra e referência. O eletrodo terra foi colocado na fronte e o eletrodo referência na têmpora ipsilateral dos sujeitos (Figura 14), sobre pasta condutora (*Ten20*, Weaver and Company, Estados Unidos) aplicada no local após limpeza com gel abrasivo (*Nuprep*, Weaver and Company, Estados Unidos). O eletrodo de registro foi composto por um filamento unipolar (DTL, UniMed Electrode Supplies) cuja fibra condutiva é conectada a um fio semelhante ao do eletrodo para o EEG (Dawson, Trick, & Litzkow, 1979). O eletrodo de registro foi fixado no canto nasal e no canto temporal do olho examinado, através de fita adesiva, de forma a ficar posicionado na porção interna da pálpebra inferior (Figura 14). Nos pacientes foi utilizada uma gota de colírio anestésico antes da colocação do eletrodo de registro, mas na maioria dos controles isso não foi necessário.

Figura 14. Foto apresentando o posicionamento dos eletrodos durante o ERG. O eletrodo terra foi colocado na fronte e o eletrodo referência na têmpora ipsilateral dos sujeitos, sobre pasta condutora (*Ten20*, Weaver and Company, Estados Unidos) aplicada no local após limpeza com gel abrasivo (*Nuprep*, Weaver and Company, Estados Unidos). O eletrodo de registro foi fixado no canto nasal e no canto temporal do olho examinado, através de fita adesiva, de forma a ficar posicionado na porção interna da pálpebra inferior.

Após o posicionamento dos eletrodos, mediu-se a impedância da corrente elétrica entre o eletrodo de registro e o eletrodo terra, assim como entre o eletrodo referência e o eletrodo terra. Caso os valores estivessem acima de 5 K Ω os eletrodos eram retirados e colocados novamente com o mesmo procedimento, até alcançar valores abaixo de 5 K Ω .

Após 30 minutos de adaptação ao escuro foi solicitado ao sujeito que se posicionasse na cúpula de estímulos (*Ganzfeld*) apoiando o queixo e a testa nos locais designados para isso no equipamento. A duração de todo o procedimento eletrofisiológico foi, em média, 50 minutos.

Protocolos

Seis tipos diferentes de estímulos visuais foram empregados para a avaliação do ERG de campo total. Os valores de luminância dos estímulos

estão apresentados em $\text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ ou cd/m^2 e Troland fotópico, considerando um diâmetro pupilar de 8 mm. Protocolos utilizados:

ERG escotópico: flash de rápida apresentação (≤ 5 ms) com luz branca de $0,095 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ (4,8 Tds) de intensidade. Os flashes foram apresentados no escuro após adaptação do sujeito durante 30 minutos ao escuro. Foram realizadas, no mínimo, 10 apresentações do estímulo, sendo considerada a resposta final a média dos sinais registrados em todas as apresentações. O intervalo entre as apresentações foi de 2 s.

ERG fotópico: flash de rápida apresentação (≤ 5 ms) com luz branca de $3 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ (150 Tds). Os flashes foram apresentados sobre um fundo de luz branca com intensidade de $25 \text{ cd}/\text{m}^2$ (1256 Td) após adaptação do sujeito durante 10 minutos a esse fundo para garantir a saturação dos bastonetes. Foram realizadas, no mínimo, 10 apresentações do estímulo, sendo considerada a resposta final a média dos sinais registrados em todas as apresentações. O intervalo entre os flashes foi de 2 s.

ERG mesópico ON e OFF: modulação em formato de dente de serra com luminância média baixa ($1 \text{ cd}/\text{m}^2$ ou 50,2 Td). Os protocolos mesópicos ON e OFF foram aplicados logo após o protocolo escotópico, com o sistema visual ainda adaptado a baixa luminância. Foram realizadas, no mínimo, 40 apresentações do estímulo, sendo considerada a resposta final a média dos sinais registrados em todas as apresentações. A frequência temporal foi 4 Hz. Para evitar artefatos no início das medidas, os registros das duas primeiras varreduras foram descartados. No protocolo mesópico ON a luminância aumentava rapidamente de 0 até $2 \text{ cd}/\text{m}^2$ e diminuía de forma linear. No

protocolo mesópico OFF a luminância diminuía rapidamente de 2 cd/m² para 0 e aumentava de forma linear.

ERG fotópico ON e OFF: modulação em formato de dente de serra com luminância média alta (250 cd/m² ou 12560 Td). Os protocolos fotópicos ON e OFF foram aplicados logo após o protocolo do ERG fotópico, ou seja, com o sistema visual adaptado ao claro. Foram realizadas, no mínimo, 40 apresentações do estímulo, sendo considerada a resposta final a média dos sinais registrados em todas as apresentações. A frequência temporal foi 4 Hz. Para evitar artefatos no início das medidas, os registros das duas primeiras varreduras foram descartados. No protocolo fotópico ON a luminância aumentava rapidamente de 0 para 500 cd/m² e diminuía de forma linear. No protocolo fotópico OFF a luminância diminuía rapidamente de 500 cd/m² para 0 e aumentava de forma linear.

O ERG com modulação da luminância em dente de serra foi utilizado em frequência temporal (4 Hz) suficientemente alta para que o sinal fosse pouco contaminado por movimentos oculares e/ou palpebrais e suficientemente baixa para possibilitar a avaliação dos componentes da resposta no domínio do tempo. Frequências temporais mais altas poderiam sobrepor os ciclos de respostas.

No protocolo do ERG escotópico foi medida a amplitude e o tempo implícito da onda-b. No protocolo do ERG fotópico foram medidas as amplitudes e os tempos implícitos das ondas -a, -b, da Resposta Fotópica Negativa (RFN) e dos dois potenciais oscilatórios (PO1 e PO2). Nos protocolos ON foram analisadas as médias das amplitudes dos quatro ciclos e o tempo implícito do primeiro pico dos componentes negativos e positivos. Nos

protocolos OFF foram analisadas as médias das amplitudes dos quatro ciclos e o tempo implícito do primeiro pico dos componentes positivos.

No caso dos componentes negativos a amplitude foi medida do ponto inicial até o ponto mais negativo do sinal e no caso dos componentes positivos a amplitude foi a medida do ponto mais negativo até o ponto mais positivo do sinal. A amplitude da resposta fotópica negativa (RFN) foi medida do ponto mais positivo até o segundo ponto mais negativo do sinal. As amplitudes dos POs foram calculadas a partir do ponto mais negativo até o pico do respectivo PO. O tempo implícito de todos os componentes foi medido a partir do ponto inicial do sinal, que foi o momento de apresentação do estímulo, até o momento do pico do componente. A amplitude é expressa em μV e o tempo implícito em ms.

Análise dos resultados

Primeiramente, foi realizada a normalização da resposta, ou seja, todos os pontos do sinal foram subtraídos da média dos cinco primeiros pontos do mesmo sinal. Os sinais normalizados foram processados através de rotinas programadas no MATLAB (TheMathWorks, Estados Unidos). Um filtro passa baixa foi utilizado para eliminar as frequências temporais acima de 50 Hz dos sinais para os protocolos ON e OFF. Através da análise do sinal no domínio do tempo, foram obtidos os valores de amplitude (em μV) e tempo implícito (em ms) dos componentes negativos e positivos das respostas. No caso dos protocolos ON e OFF, uma amplitude média, calculada através das amplitudes de respostas dos quatro ciclos, foi obtida. Amplitudes menores que 2 μV foram consideradas respostas não detectáveis.

3.3 Avaliação Psicofísica - Sensibilidade ao Contraste

Equipamento

O sistema utilizado para avaliação psicofísica foi o PSYCHO (Cambridge Research Systems, Reino Unido), composto de programa computadorizado para controle de experimentos e monitor para apresentação de estímulos CRT FD Trinitron CPD-G420 de 19" e 12 bits (Sony Electronics Inc., Tokyo, Japão), com frequência temporal da taxa de atualização de 100 Hz e resolução espacial de 800 x 640 pixels (Figura 15). O programa funciona em microcomputador do tipo PC, com sistema operacional Windows 98 da *Microsoft*[®], equipado com placa gráfica VSG 2/4. A correção gama foi realizada através de um instrumento de medida da luminância do próprio equipamento (Cambridge Research Systems, Reino Unido).

Procedimento

Os sujeitos foram posicionados a 1 m de distância do monitor de estímulos, sentados em cadeira ou utilizando a própria cadeira de rodas, em sala totalmente escurecida. Foram instruídos a manter o olhar na cruz localizada no centro do monitor de estímulos, piscar o olho normalmente e avisar em caso de qualquer desconforto ou escurecimento da imagem, que pode ocorrer quando o olho dominante é ocluído. Neste caso, o teste era parado por alguns segundos para que o sujeito pudesse descansar. A tarefa do sujeito era responder verbalmente, a cada apresentação do estímulo, dizendo sim (quando via o estímulo) ou não (quando não via o estímulo). As respostas

foram registradas pelo experimentador através do teclado do microcomputador. A avaliação psicofísica demorava, em média, 30 minutos.

O procedimento psicofísico foi o método da escada com mudança linear do contraste. O estímulo era apresentado em todas as tentativas (35 vezes para cada frequência espacial ou temporal ou para cada condição de estímulo no caso do teste do xadrez). O contraste diminuía 3 dB a cada resposta positiva e aumentava 1,5 dB a cada resposta negativa. O limiar de contraste foi expresso como a média aritmética dos menores valores de contraste que produziram uma resposta positiva nas seis últimas reversões. A sensibilidade ao contraste foi estimada através do inverso do limiar de contraste.

Figura 15. Foto do sistema PSYCHO (Cambridge Research Systems, Reino Unido) utilizado para a avaliação psicofísica.

Estímulos Visuais

Os parâmetros dos protocolos psicofísicos utilizados no presente estudo foram previamente estabelecidos para a obtenção de um banco de normas de diferentes faixas etárias para o Laboratório da Visão – Eletrofisiologia e Psicofísica Visual Clínica do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo (Moreira, 2010).

Para avaliação psicofísica da sensibilidade ao contraste positivo (protocolo ON) e negativo (protocolo OFF) de luminância foi utilizado o teste do xadrez (Costa et al., 2007a; Costa, 2011), adaptado de um teste anteriormente utilizado para medidas dos potenciais corticais provocados visuais (Benoff et al., 2001). Os estímulos consistiram em quadrados em forma de tabuleiro de xadrez de 17 cm x 17 cm (aproximadamente 10° de ângulo visual a um m) substituídos por um fundo homogêneo (coordenada CIE: $x = 0,34$ e $y = 0,35$ e luminância média: $56,7 \text{ cd/m}^2$) durante 500 ms. Os estímulos apresentavam modulação positiva ou negativa da luminância em relação ao fundo (Figura 16). Ambos os protocolos foram realizados para duas condições de estimulação: i) frequência espacial baixa (0,3 cpg) e duração curta (33 ms); e ii) frequência espacial intermediária (2 cpg) e duração longa (1500 ms). A frequência espacial baixa (0,3 cpg) associada a duração curta favorece a atividade da via visual magnocelular. Ao contrário, a frequência espacial de 2 cpg associada a duração longa favorece a atividade da via visual parvocelular (Costa et al., 2007a; Costa, 2011). Dessa maneira, os protocolos foram nomeados como: Magno-ON, Magno-OFF, Parvo-ON e Parvo-OFF. O intervalo entre as apresentações dos estímulos foi 300 ms para os quatro protocolos.

Figura 16. Representação dos estímulos utilizados para o teste do xadrez: contraste positivo = ON (A e C) e contraste negativo = OFF (B e D). As frequências espaciais foram 0,3 (Magno) ou 2 (Parvo) cpg e durações dos estímulos foram 33 (Magno) ou 1500 (Parvo) ms.

Para avaliação da sensibilidade ao contraste espacial de luminância, os estímulos consistiram em grades horizontais acromáticas (coordenada CIE: $x = 0,34$ e $y = 0,35$) estáticas de 17×17 cm (aproximadamente 10° de ângulo visual a 1 m) com variação senoidal da luminância. As grades foram apresentadas sobre um fundo de mesma cromaticidade, com luminância média (48 cd/m^2) igual à dos estímulos. As frequências espaciais utilizadas foram 0,4 ciclos por grau (cpg), 1,6 cpg, 6,2 cpg e 12,5 cpg (Figura 17). O tempo de

apresentação do estímulo foi 6 s e o intervalo entre as apresentações dos estímulos 300 ms.

Para a avaliação da sensibilidade ao contraste temporal de luminância, os estímulos consistiram em círculos acromáticos de 7 cm de diâmetro (aproximadamente 4° de ângulo visual a 1 m) com uma variação espacial Gaussiana e com variação temporal senoidal da luminância. Os estímulos foram apresentados sobre um fundo de cromaticidade média (coordenada CIE: $x = 0,34$ e $y = 0,35$) e luminância média (53,5 cd/m²) iguais as dos estímulos (Figura 18). As frequências temporais utilizadas foram 2,5; 5; 10 e 20 Hz. O tempo de apresentação do estímulo foi 6 s e o intervalo entre as apresentações dos estímulos 300 ms.

Análise dos resultados

A sensibilidade ao contraste positivo (ON) e negativo (OFF) de luminância foi obtida para os protocolos Magno e Parvo. Da mesma maneira, a sensibilidade ao contraste foi obtida para cada frequência espacial e temporal avaliadas. Os resultados foram comparados entre controles e jovens com DMD. Além disso, os resultados dos controles e de jovens com DMD foram normalizados dividindo cada resultado individual pela média do grupo controle para identificar resultados abaixo e acima da linha média de normalidade.

Figura 17. Representação dos estímulos utilizados para a avaliação da sensibilidade ao contraste espacial de luminância. Os estímulos foram apresentados de maneira estática, ou seja, sem modulação temporal. Durante o teste a apresentação foi aleatória para as quatro frequências espaciais avaliadas.

Figura 18. Representação dos estímulos utilizados para a avaliação da sensibilidade ao contraste temporal de luminância. Durante o teste a apresentação foi aleatória para as quatro frequências temporais avaliadas.

3.4 Análise estatística

O teste estatístico *Shapiro-Wilk* foi utilizado para verificar a normalidade da amostra e a maioria dos resultados obtidos no presente estudo apresentou diferença estatística significativa em relação à distribuição normal. Portanto, o teste estatístico não-paramétrico *Mann-Whitney U* (*Wilcoxon Test*) e o teste de correlação de *Spearman* foram utilizados para comparação dos resultados entre controles e jovens com DMD e para verificar a correlação dos resultados, respectivamente. Para todos os testes estatísticos o nível de significância aceito foi acima de 95%, correspondente a um valor de $p < 0,05$. Os programas utilizados para as análises estatísticas foram o SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) e o Statistica 6.0.

4. Resultados

4.1 Avaliação Eletrofisiológica

A Figura 19 apresenta os ERGs de campo total de um sujeito do grupo controle obtidos em resposta às diferentes condições de estimulação luminosa indicando os parâmetros que foram medidos. O ERG escotópico (Figura 19A) teve o objetivo de avaliar as respostas da retina iniciadas, predominantemente, pelos bastonetes. A resposta apresentou um componente positivo (onda-b). O ERG fotópico (Figura 19B) teve o objetivo de avaliar as respostas da retina iniciadas pelos cones. A resposta apresentou um componente inicial negativo (onda-a), seguido por um componente positivo de maior amplitude (onda-b) e por um segundo componente negativo, a resposta fotópica negativa (RFN). Além disso, houve oscilações na curva ascendente que são os potenciais oscilatórios (POs).

O ERG mesópico ON (Figura 19C) teve o objetivo de avaliar as respostas da retina iniciadas principalmente pelos bastonetes, mas que ativam, preferencialmente, a via visual ON devido ao aumento rápido da luminância do estímulo. A resposta apresentou um componente inicial negativo (onda-a), seguido por um componente positivo de maior amplitude (onda-b). O ERG mesópico OFF (Figura 19D) teve o objetivo de avaliar as respostas da retina iniciadas principalmente pelos bastonetes, mas que ativam, preferencialmente, a via visual OFF devido à diminuição rápida da luminância do estímulo. A resposta apresentou um formato de onda tipo senóide cujo pico positivo foi

considerado a onda-b do sinal. A onda-d dessa resposta pode ser identificada como uma pequena inflexão que ocorre durante a queda da onda-b.

O ERG fotópico ON (Figura 19E) teve o objetivo de avaliar as respostas da retina iniciadas pelos cones que ativam, preferencialmente, a via visual ON devido ao aumento rápido da luminância do estímulo. A resposta apresentou um componente inicial negativo (onda-a), seguido por um componente positivo (onda-b). O ERG fotópico OFF (Figura 19F) teve o objetivo de avaliar as respostas da retina iniciadas pelos cones que ativam, preferencialmente, a via visual OFF devido à diminuição rápida da luminância do estímulo. A resposta apresentou um componente positivo (onda-d).

Os resultados serão apresentados em sete subtópicos, um para cada protocolo do ERG utilizado e, por último, haverá um subtópico dedicado às análises de correlação dos resultados com a idade, com o quociente de inteligência (QI), o tempo de uso de corticóides e os resultados genéticos dos jovens com DMD.

A ERG escotópico

Flash = $0,095 \text{ cds/m}^2 \leq 5 \text{ ms}$
Adaptado ao escuro

B ERG fotópico

Flash = $3 \text{ cds/m}^2 \leq 5 \text{ ms}$
Adaptado ao claro = 25 cd/m^2

C ERG mesópico ON = 1 cd/m^2

D ERG mesópico OFF = 1 cd/m^2

E ERG fotópico ON = 250 cd/m^2

F ERG fotópico OFF = 250 cd/m^2

Figura 19. ERGs de campo total de um sujeito do grupo controle obtidos em resposta às diferentes condições de estimulação luminosa indicando os parâmetros que foram utilizados nos estímulos e medidos nas respostas. Observe que as barras das escalas de amplitude e tempo são diferentes para os protocolos escotópico e fotópico.

4.1.1 ERG escotópico

O ERG escotópico obtido é a média de pelo menos 10 registros consecutivos. Para o grupo controle o tempo implícito médio da onda-b foi de $79,1 \pm 9,3$ ms (faixa de 64 a 103 ms) e a amplitude foi de $334,3 \pm 101,4$ μ V (faixa de variação entre 168,5 e 643,7 μ V). O ERG escotópico foi obtido em oito jovens com DMD: dois jovens com alterações genéticas anteriores ao exon 30 (*upstream* 30) e seis jovens com alterações genéticas posteriores ao exon 30 (*downstream* 30). A Figura 20 apresenta exemplos típicos de registros do ERG escotópico. Os quadrados com linhas pontilhadas representam os limites normais para a amplitude (linhas verticais) e para o tempo implícito (linhas horizontais) da onda-b, considerando a média $\pm$ um desvio padrão dos controles.

O ERG escotópico de um sujeito representativo do grupo controle está apresentado na Figura 20A. A figura 20B apresenta a resposta de um jovem com DMD *upstream* 30. A amplitude de resposta foi de 194,9 μ V e tempo implícito de 90 ms. As figuras 20C e 20D mostram as respostas de dois jovens com DMD *downstream* 30, ambos com rebaixamento da onda-b do ERG escotópico.

A Figura 21 mostra os resultados de amplitude (acima) e tempo implícito (abaixo) da onda-b do ERG escotópico, apresentando a média e o desvio padrão dos controles e os resultados individuais de jovens com DMD. Dois dos seis jovens com DMD *downstream* 30 avaliados apresentaram respostas não detectáveis, ou seja, amplitudes menores que 2 μ V (resultados sobrepostos no gráfico) e portanto não foi possível obter os seus tempos implícitos. Os dois

DMDs *upstream* 30 avaliados e quatro DMDs *downstream* 30 com onda-b detectável apresentaram amplitudes reduzidas ($p < 0,05$). Entretanto, os DMDs *upstream* 30 e dois DMDs *downstream* 30 apresentaram tempos implícitos semelhantes à média dos controles. Os tempos implícitos dos outros dois DMDs *downstream* 30 estão elevados em comparação aos controles.

A tabela 3 apresenta os resultados numéricos de amplitude e tempo implícito do ERG escotópico de controles e jovens com DMD. Observe que os tempos implícitos dos jovens com DMD estão apresentados individualmente.

Tabela 3. Resultados de amplitude e tempo implícito do ERG escotópico para o grupo controle e para os jovens com DMD.

onda-b	Amplitude (μV)	Tempo Implícito (ms)
Controles (N = 30)	334,3 $\pm$ 101,4	79,1 $\pm$ 9,3
DMDs <i>upstream</i> 30 (N = 2)	113,4 e 194,9	77 e 90
DMDs <i>downstream</i> 30 (N = 6)	27,1 $\pm$ 25,5	84 - 129 - 114 - 80
valor de p^*	< 0,01	

*Mann-Whitney U Test, comparação entre controles e DMDs *downstream* 30.

Figura 20. ERG escotópico. Os quadrados com linhas pontilhadas representam os limites normais da onda-b (média $\pm$ um desvio padrão) para a amplitude (linhas verticais) e o tempo implícito (linhas horizontais) obtidos com os resultados dos controles. Resposta de um sujeito representativo do grupo controle (A), e respostas de três jovens com DMD: um jovem *upstream* 30 (B) e dois jovens *downstream* 30 (C e D).

- Média (desvio padrão) dos controles (N = 30)
- DMDs *upstream* 30 (N = 2)
- DMDs *downstream* 30 (N = 6)

Figura 21. Amplitude (acima) e tempo implícito (abaixo) da onda-b do ERG escotópico. Quadrado: média $\pm$ um desvio padrão dos resultados dos controles; círculos vazios: resultados de dois DMDs *upstream* 30; círculos cheios: resultados dos seis DMDs *downstream* 30. Observe que os resultados de amplitude dos DMDs *downstream* 30 estão sobrepostos. As amplitudes de todos os jovens com DMD encontram-se reduzidas em relação aos controles. Dois jovens com DMD *downstream* 30 apresentaram, além da amplitude reduzida, tempos implícitos atrasados e em outros dois não foi possível medir o tempo implícito devido à amplitude muito reduzida ($< 2 \mu V$). *diferença estatisticamente significativa entre controles e DMDs *downstream* 30.

4.1.2 ERG fotópico

O ERG fotópico foi obtido com pelo menos 10 registros consecutivos. O tempo implícito da onda-a ocorreu entre 16 e 21 ms (média = $19,2 \pm 1$ ms) e a amplitude variou de 17,6 a 72,3 μV (média = $46,7 \pm 13,7$ μV) para o grupo controle. A onda-a foi seguida por um componente positivo (onda-b) de maior amplitude cujo pico ocorreu entre 36 e 43 ms (média = $40,2 \pm 1,6$ ms) e cuja amplitude variou de 73,8 a 235,3 μV (média = $151,9 \pm 39,9$ μV) para o grupo controle.

O ERG fotópico apresentou uma resposta fotópica negativa (RFN) que ocorreu entre 50 e 59 ms (média = $55,6 \pm 2,1$) após a apresentação do estímulo e cuja amplitude variou entre 70,4 e 241,5 μV (média = $145,4 \pm 42,3$ μV) para o grupo controle. O ramo ascendente da onda-b apresentou duas oscilações: o potencial oscilatório 1 (PO1) e o potencial oscilatório 2 (PO2). O PO1 apresentou amplitude média de $53,4 \pm 15,5$ μV e o PO2 de $87,3 \pm 23,3$ μV . O tempo implícito médio foi $25,6 \pm 0,9$ ms para o PO1 e $33,1 \pm 0,8$ para o PO2 no grupo controle. Todos os sujeitos do grupo controle apresentaram o PO1, entretanto cinco dos 30 sujeitos não apresentaram o PO2.

A Figura 22A apresenta o registro de um sujeito representativo do grupo controle. O registro do ERG fotópico foi obtido em oito jovens com DMD: dois jovens com deleção *upstream* 30 e seis *downstream* 30. A figura 22B apresenta a resposta de um jovem com DMD *upstream* 30. Este jovem apresentou amplitude da onda-b reduzida (55,7 μV) e tempo implícito dentro do esperado (39 ms). As figuras 22C e 22D apresentam os resultados de dois jovens com DMD *downstream* 30. Ambos os jovens apresentaram amplitudes

reduzidas em relação à média dos controles. Dois jovens *downstream* 30 apresentaram onda-b não detectável, ou seja, com amplitude inferior a 2 μV e, nesse caso não foi possível medir os tempos implícitos. Os quadrados com linhas pontilhadas representam os limites normais obtidos através da média $\pm$ um desvio padrão dos controles.

A comparação entre ERGs fotópicos dos dois grupos mostrou que não houve diferença estatística entre as amplitudes de controles e jovens com DMD para a onda-a ($p > 0,05$), mas que para a onda-b os jovens com DMD apresentaram amplitudes reduzidas em comparação aos controles ($p < 0,05$), enquanto os tempos implícitos da onda-a e da onda-b ($p > 0,05$) foram semelhantes para todos os grupos (Figura 23).

A Figura 24 apresenta os resultados de amplitude (acima) e tempo implícito (abaixo) de controles e de jovens com DMD para o PO1 (esquerda) e o PO2 (direita). Quatro jovens com DMD não apresentaram o PO1 e cinco não apresentaram o PO2. Para os que apresentaram POs, houve redução da amplitude em relação aos controles (PO1 e PO2 $p < 0,05$), entretanto não houve diferença para o tempo implícito do PO1 e do PO2 ($p > 0,05$). O mesmo ocorreu com a RFN (Figura 25): houve redução da amplitude ($p < 0,05$) sem atraso na resposta ($p > 0,05$) para os jovens com DMD.

As Tabelas 4, 5 e 6 apresentam os resultados de controles e jovens com DMD para todos os componentes avaliados da resposta fotópica.

Figura 22. ERG fotópico. Os quadrados com linhas pontilhadas representam os limites normais para a amplitude (linhas verticais) e o tempo implícito (linhas horizontais) da onda-a e da onda-b obtidos pela média $\pm$ um desvio padrão dos controles. Registro individual de um sujeito representativo do grupo controle (A), e registros individuais de três jovens com DMD: um jovem *upstream* 30 (B) e dois jovens *downstream* 30 (C e D).

Figura 23. Amplitude (acima) e tempo implícito (abaixo) da onda-a (esquerda) e onda-b (direita) do ERG fotópico. Quadrado: média $\pm$ um desvio padrão dos resultados dos controles; círculos vazios: resultados de dois DMDs *upstream* 30; círculos cheios: resultados de seis DMDs *downstream* 30. Observe que houve sobreposição dos resultados. Para a onda-a os resultados foram semelhantes. Para a onda-b houve redução da amplitude de resposta, com tempo implícito semelhante. *diferença estatisticamente significativa entre controles e DMDs *downstream* 30.

Tabela 4. Resultados de amplitude e tempo implícito da onda-a e da onda-b do ERG fotópico para o grupo controle e para os jovens com DMD.

	onda-a		onda-b	
	Amplitude (µV)	Tempo Implícito (ms)	Amplitude (µV)	Tempo Implícito (ms)
Controles (N = 30)	46,7 $\pm$ 13,7	19,2 $\pm$ 1	151,9 $\pm$ 39,9	40,2 $\pm$ 1,6
DMDs <i>upstream</i> 30 (N = 2)	20,7 e 31,9	19 e 20	55,7 e 60,5	39 e 38
DMDs <i>downstream</i> 30 (N = 6)	38,8 $\pm$ 11,9	20,3 $\pm$ 1,4	65,2 $\pm$ 53,7	41 $\pm$ 0,8
valor de p^*	> 0,06	> 0,2	< 0,01	> 0,2

*Mann-Whitney U Test, comparação entre controles e DMDs *downstream* 30.

- Média (desvio padrão) dos controles (N = 30 PO1 e N = 25 PO2)
- DMDs *upstream* 30 (N = 2 PO1 e N = 1 PO2) ● DMDs *downstream* 30 (N = 4 PO1 e N = 3 PO2)

Figura 24. Amplitude (acima) e tempo implícito (abaixo) do PO1 (esquerda) e do PO2 (direita) do ERG fotópico. Quadrado: média $\pm$ um desvio padrão dos resultados dos controles; círculos vazios: resultados de dois DMDs *upstream* 30; círculos cheios: resultados de DMDs *downstream* 30. Observe que houve sobreposição dos resultados em alguns casos. Para ambos os POs houve redução da amplitude sem atraso da resposta. *diferença estatisticamente significativa entre controles e DMDs *downstream* 30.

Tabela 5. Resultados de amplitude e tempo implícito do PO1 e do PO2 do ERG fotópico para o grupo controle e para os jovens com DMD.

	PO1		PO2	
	Amplitude (µV)	Tempo Implícito (ms)	Amplitude (µV)	Tempo Implícito (ms)
Controles (N = 30 e 25)	53,4 $\pm$ 15,5	25,6 $\pm$ 0,9	87,3 $\pm$ 23,3	33,1 $\pm$ 0,8
DMDs <i>upstream</i> 30 (N = 2 e 1)	21,1 e 23,2	23 e 27	32,2 e —	32 e —
DMDs <i>downstream</i> 30 (N = 4 e 3)	30,1 $\pm$ 18,5	27,3 $\pm$ 0,1	47,3 $\pm$ 41,7	33,8 $\pm$ 0,1
valor de p^*	< 0,02	> 0,05	< 0,02	> 0,5

*Mann-Whitney U Test, comparação entre controles e DMDs *downstream* 30.

- Média (desvio padrão) dos controles (N = 30)
- DMDs *upstream* 30 (N = 2)
- DMDs *downstream* 30 (N = 6)

Figura 25. Amplitude (acima) e tempo implícito (abaixo) da RFN do ERG fotópico. Quadrado: média $\pm$ um desvio padrão dos resultados dos controles; círculos vazios: resultados de dois DMDs *upstream* 30; círculos cheios: resultados de DMDs *downstream* 30. Observe que houve sobreposição dos resultados em alguns casos. Houve redução da amplitude sem atraso da resposta. *diferença estatisticamente significativa entre controles e DMDs *downstream* 30.

Tabela 6. Resultados de amplitude e tempo implícito para a resposta fotópica negativa do ERG fotópico para o grupo controle e para os jovens com DMD.

RFN	Amplitude (µV)	Tempo Implícito (ms)
Controles (N = 30)	145,4 $\pm$ 42,3	55,6 $\pm$ 2,1
DMDs <i>upstream</i> 30 (N = 2)	59,8 e 64,7	56 e 58
DMDs <i>downstream</i> 30 (N = 6)	55,9 $\pm$ 43,3	55,8 $\pm$ 3
valor de p^*	< 0,01	> 0,6

*Mann-Whitney U Test, comparação entre controles e DMDs *downstream* 30.

4.1.3 ERG mesópico ON

O ERG mesópico ON foi obtido em 10 jovens com DMD. Houve uma onda bifásica para cada ciclo de resposta com um componente inicial negativo (onda-a) seguido por um componente positivo (onda-b) de maior amplitude. A Figura 26 apresenta registros médios obtidos a partir de, pelo menos, 40 registros consecutivos, para alguns sujeitos: um sujeito representativo do grupo controle (Figura 26A), um jovem com DMD *upstream* 30 (Figura 26B) e dois jovens com DMD *downstream* 30 (Figuras 26C e 26D).

As média das amplitudes e os tempos implícitos estão apresentados na figura 27 para os resultados individuais de controles e jovens com DMD. Cada ponto representa o tempo implícito no eixo X (medido para o primeiro pico da resposta) e a amplitude da resposta no eixo Y para a onda-a (acima) e onda-b (abaixo). Dois dos oito jovens *downstream* 30 apresentaram onda-b não detectável, ou seja, amplitude menor que 2 μV e, dessa maneira, não foi possível medir os tempos implícitos.

Figura 26. ERG mesópico ON. Resposta de um sujeito representativo do grupo controle (A), e respostas de três jovens com DMD: um jovem *upstream* 30 (B) e dois jovens *downstream* 30 (C e D). Abaixo está representada a modulação temporal da luminância do estímulo em forma de dente de serra.

- Controles (N=30)
- DMDs *upstream* 30 (N = 2)
- DMDs *downstream* 30 (N = 8 onda-a e N = 6 onda-b)

Figura 27. Amplitude de respostas em relação ao tempo implícito para o protocolo mesópico ON. Os quadrados cinzas representam os resultados individuais de 30 sujeitos do grupo controle; os círculos vazios representam os resultados de dois jovens com DMD *upstream* 30; os círculos cheios representam os resultados individuais de oito jovens com DMD *downstream* 30 (considerando que dois jovens não apresentaram picos de respostas para a onda-b). Observe que para a onda-a as amplitudes foram semelhantes entre controles e pacientes, entretanto o tempo implícito apresentou-se muito variável. Para a onda-b, a amplitude dos jovens com DMD apresentou-se reduzida em relação aos controles e alguns jovens apresentaram tempos implícitos atrasados.

A Figura 28 mostra os resultados de amplitude (acima) e tempo implícito (abaixo) da onda-a (esquerda) e da onda-b (direita) do ERG mesópico ON para a média e o desvio padrão dos controles e os resultados individuais de jovens com DMD. O pico da onda-a ocorreu entre 25 e 40 ms (média = $34 \pm 3,6$ ms) após a apresentação do estímulo. A amplitude de respostas variou de 3,3 a 20,2 μV (média = $10,9 \pm 4,3$ μV) para o grupo controle. O pico da onda-b ocorreu entre 66 e 107 ms (média = $81,1 \pm 10$ ms) após a apresentação do estímulo e a amplitude média variou de 20,8 a 93,3 μV (média = $49,9 \pm 16$ μV) para o grupo controle.

A amplitude da onda-a foi semelhante entre os jovens com DMD *downstream* 30 e o grupo controle ($p > 0,05$). O tempo implícito da onda-a apresentou-se atrasado para os jovens com DMD *downstream* 30 ($p < 0,05$). Entretanto, os dois jovens *upstream* 30 apresentaram tempos implícitos semelhantes aos do grupo controle. A amplitude da onda-b apresentou-se reduzida para os jovens com DMD ($p < 0,05$). No caso do tempo implícito da onda-b, três jovens com DMD *downstream* 30 apresentaram tempos implícitos atrasados e outros três apresentaram tempos implícitos semelhantes aos dos controles. Os dois jovens com DMD *upstream* 30 também apresentaram tempos implícitos semelhantes aos do grupo controle.

A tabela 7 apresenta os resultados numéricos de amplitude e tempo implícito do ERG mesópico ON de controles e jovens com DMD. Observe que os tempos implícitos dos jovens com DMD estão apresentados individualmente.

□ Média (desvio padrão) dos controles (N = 30)
 ○ DMDs *upstream* 30 (N = 2) ● DMDs *downstream* 30 (N = 8)

Figura 28. Amplitude (acima) e tempo implícito (abaixo) da onda-a (esquerda) e onda-b (direita) do ERG mesópico ON. Quadrado: média $\pm$ um desvio padrão dos resultados dos controles; círculos vazios: resultados de dois DMDs *upstream* 30; círculos cheios: resultados de oito DMDs *downstream* 30. Observe que para o tempo implícito dos controles em ambas as ondas o desvio padrão não aparece porque é pequeno (onda-a = $\pm 3,6$ ms e onda-b = ± 10 ms). O tempo implícito da onda-a foi estatisticamente diferente entre controles e DMDs *downstream* 30. Para a onda-b, a amplitude apresentou redução significativa para os jovens com DMD. O tempo implícito da onda-b foi semelhante para alguns jovens com DMD e para outros foi atrasado. *diferença estatisticamente significativa entre controles e DMDs *downstream* 30.

Tabela 7. Resultados de amplitude e tempo implícito da onda-a e da onda-b do ERG mesópico ON para o grupo controle e para os jovens com DMD.

	onda-a		onda-b	
	Amplitude (μ V)	Tempo Implícito (ms)	Amplitude (μ V)	Tempo Implícito (ms)
Controles (N = 30)	10,9 $\pm$ 4,3	34 $\pm$ 3,6	49,9 $\pm$ 16	81,1 $\pm$ 10
DMDs <i>upstream</i> 30 (N = 2)	5,5 e 8	37 e 8	25,9 e 41,5	83 e 95
DMDs <i>downstream</i> 30 (N = 8 e 6)	11,7 $\pm$ 4,9	67,8 $\pm$ 37,1	22,1 $\pm$ 19,2	63-76-79 256-260-284
valor de p^*	> 0,7	< 0,02	< 0,02	

*Mann-Whitney U Test, comparação entre controles e DMDs *downstream* 30.

4.1.4 ERG mesópico OFF

O ERG mesópico OFF foi obtido em 10 jovens com DMD. A resposta apresentou um formato tipo senoidal. O componente positivo foi considerado a onda-b da resposta. A Figura 29 apresenta respostas médias obtidas a partir de, pelo menos, 40 registros consecutivos. A Figura 29A apresenta o registro de um sujeito representativo do grupo controle. A Figura 29B apresenta a resposta de um jovem com DMD *upstream* 30. As Figuras 29C e 29D apresentam os resultados de dois jovens com DMD *downstream* 30.

Os valores de amplitude e os tempos implícitos estão apresentados na Figura 30 através dos resultados individuais de controles e jovens com DMD. Cada ponto representa o tempo implícito no eixo X e a amplitude da resposta no eixo Y para a onda-b. Quatro dos oito jovens *downstream* 30 avaliados apresentaram respostas não detectáveis, ou seja, amplitude menor que 2 μV e, dessa maneira, não foi possível medir os tempos implícitos.

O pico da onda-b ocorreu entre 166 e 289 ms (média = $219,3 \pm 32,4$ ms) após a apresentação do estímulo e a amplitude média variou de 15,3 a 99,4 μV (média = $48,2 \pm 19,3$ μV) para o grupo controle. A Figura 31 apresenta a média e o desvio padrão dos controles e os resultados individuais de jovens com DMD para a amplitude (acima) e tempo implícito (abaixo) da onda-b do ERG mesópico OFF.

Figura 29. ERG mesópica OFF. Resposta de um sujeito representativo do grupo controle (A), e de três jovens com DMD: um jovem *upstream* 30 (B) e dois jovens *downstream* 30 (C e D). Abaixo está representada a modulação temporal da luminância do estímulo em forma de dente de serra.

Figura 30. ERG mesópico OFF. Amplitude e tempo implícito para os controles (n=30; quadrados cinza); dois jovens com DMD *upstream* 30 (círculos vazios); quatro jovens com DMD *downstream* 30 (círculos cheios). Observe que as amplitudes estão reduzidas para os jovens com DMD em relação aos controles, entretanto os tempos implícitos são semelhantes.

A amplitude da onda-b apresentou-se reduzida para os jovens *downstream* 30 ($p < 0,05$), entretanto não houve diferença significativa para o tempo implícito ($p > 0,05$). Os dois jovens com DMD *upstream* 30 apresentaram valores de amplitude e tempo implícito semelhantes aos do grupo controle.

A tabela 8 apresenta os resultados numéricos de amplitude e tempo implícito do ERG mesópico OFF de controles e jovens com DMD.

- Média (desvio padrão) dos controles (N = 30)
- DMDs *upstream* 30 (N = 2)
- DMDs *downstream* 30 (N = 8)

Figura 31. Amplitude (acima) e tempo implícito (abaixo) da onda-b do ERG mesópico OFF. Quadrado: média $\pm$ um desvio padrão dos resultados dos controles; círculos vazios: resultados de dois DMDs *upstream* 30; círculos cheios: resultados de DMDs *downstream* 30. As amplitudes dos jovens com DMD *downstream* 30 encontram-se reduzidas em relação aos controles. Os dois jovens com DMD *upstream* 30 apresentaram respostas normais. O tempo implícito foi semelhante para controles e jovens com DMD. *diferença estatisticamente significativa entre controles e DMDs *downstream* 30.

Tabela 8. Resultados de amplitude e tempo implícito do ERG mesópico OFF para o grupo controle e para os jovens com DMD.

onda-b	Amplitude (µV)	Tempo implícito (ms)
Controles (N = 30)	48,2 $\pm$ 19,3	219,3 $\pm$ 32,4
DMDs <i>upstream</i> 30 (N = 2)	31,7 e 34,9	251 e 228
DMDs <i>downstream</i> 30 (N = 8)	12,9 $\pm$ 16,1	209,5 $\pm$ 47,7
valor de p^*	< 0,02	> 0,5

*Mann-Whitney U Test, comparação entre controles e DMDs *downstream* 30.

4.1.5 ERG fotópico ON

O ERG fotópico ON foi obtido em 10 jovens com DMD e apresentou uma onda bifásica com um componente inicial negativo (onda-a) seguido por um componente positivo (onda-b). A Figura 32 apresenta as respostas de alguns sujeitos representativos. Estes são registros médios obtidos a partir de, pelo menos, 40 registros consecutivos.

A Figura 32A apresenta a resposta de um sujeito representativo do grupo controle. A figura 32B apresenta a resposta de um jovem com DMD *upstream* 30. As figuras 32C e 32D apresentam as respostas de dois jovens com DMD *downstream* 30.

Os valores de amplitude e os tempos implícitos estão apresentados na Figura 33 através dos resultados individuais de controles e jovens com DMD. Cada ponto representa o tempo implícito no eixo X e a amplitude da resposta no eixo Y para a onda-a (acima) e onda-b (abaixo). Apenas um dos oito jovens *downstream* 30 avaliados apresentou resposta não detectável, ou seja, amplitude menor que 2 μ V e, dessa maneira, não foi possível medir o tempo implícito.

Figura 32. ERG fotópico ON. Resposta de um sujeito representativo do grupo controle (A), e respostas de três jovens com DMD: um jovem *upstream* 30 (B) e dois jovens *downstream* 30 (C e D). Abaixo está representada a modulação temporal da luminância do estímulo em forma de dente de serra.

Figura 33. Resultados de amplitude de resposta em relação ao tempo implícito para o protocolo fotópico ON. Os quadrados cinzas representam os resultados individuais de 30 sujeitos do grupo controle; os círculos vazios representam os resultados de dois jovens com DMD *upstream* 30; os círculos cheios representam os resultados individuais de jovens com DMD *downstream* 30 (considerando que um jovem não apresentou picos de respostas para as ondas-a e -b). Observe que para a onda-a as amplitudes e os tempos implícitos foram semelhantes entre controles e pacientes. Entretanto, para a onda-b, a amplitude dos jovens com DMD apresentou-se reduzida em relação aos controles sem alteração no tempo implícito.

A Figura 34 mostra os resultados médios e o desvio padrão dos controles e os resultados individuais de jovens com DMD para a amplitude (acima) e tempo implícito (abaixo) da onda-a (esquerda) e da onda-b (direita) do ERG fotópico ON.

O pico da onda-a ocorreu entre 15 e 26 ms (média = $22 \pm 3,3$ ms) após a apresentação do estímulo e a amplitude variou de 9 a 65,4 μ V (média = $35,8 \pm 13,2$ μ V) para o grupo controle. O pico da onda-b ocorreu entre 31 e 46 ms (média = $39 \pm 3,7$ ms) após a apresentação do estímulo e a amplitude variou de 21 a 81,5 μ V (média = $52,2 \pm 16,4$ μ V) para o grupo controle.

A amplitude da onda-a foi semelhante entre os jovens com DMD *downstream* 30 e o grupo controle ($p > 0,05$). Também não houve diferença significativa para o tempo implícito da onda-a entre os jovens com DMD *downstream* 30 e o grupo controle ($p > 0,05$).

A amplitude da onda-b apresentou-se reduzida para os jovens com DMD. No caso dos jovens *downstream* 30 a redução foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Entretanto, não houve diferença estatística para o tempo implícito da onda-b entre os jovens com DMD *downstream* 30 e o grupo controle ($p > 0,05$).

A tabela 9 apresenta os resultados numéricos de amplitude e tempo implícito do ERG fotópico ON de controles e jovens com DMD.

Figura 34. Amplitude (acima) e tempo implícito (abaixo) da onda-a (esquerda) e onda-b (direita) do ERG fotópico ON. Quadrado: média $\pm$ um desvio padrão dos resultados dos controles; círculos vazios: resultados de dois DMDs *upstream* 30; círculos cheios: resultados de DMDs *downstream* 30. Observe que há sobreposição dos pontos nos resultados de DMDs *downstream* 30. Para a onda-a apenas os DMDs *upstream* 30 apresentaram amplitudes reduzidas. O tempo implícito da onda-a foi semelhante para todos os sujeitos exceto um jovem com DMD *upstream* 30. Para a onda-b, houve redução significativa da amplitude para os jovens com DMD. O tempo implícito da onda-b foi estatisticamente semelhante para todos os sujeitos. *diferença estatisticamente significativa entre controles e DMDs *downstream* 30.

Tabela 9. Resultados de amplitude e tempo implícito da onda-a e da onda-b do ERG fotópico ON para o grupo controle e para os jovens com DMD.

	onda-a		onda-b	
	Amplitude (µV)	Tempo Implícito (ms)	Amplitude (µV)	Tempo Implícito (ms)
Controles (N = 30)	35,8 $\pm$ 13,2	22 $\pm$ 3,3	52,2 $\pm$ 16,4	39 $\pm$ 3,7
DMDs <i>upstream</i> 30 (N = 2)	14,2 e 24,3	23 e 31	17 e 16,1	40 e 44
DMDs <i>downstream</i> 30 (N = 7)	37,3 $\pm$ 15,9	24,5 $\pm$ 1,5	22,5 $\pm$ 12,3	41,1 $\pm$ 4
valor de p^*	> 0,06	> 0,08	< 0,001	> 0,2

*Mann-Whitney U Test, comparação entre controles e DMDs *downstream* 30.

4.1.6 ERG fotópico OFF

O ERG fotópico OFF foi obtido em 10 jovens com DMD e apresentou um componente positivo (onda-d). A Figura 35 apresenta respostas médias obtidas a partir de, pelo menos, 40 registros consecutivos.

A Figura 35A apresenta o registro de um sujeito representativo do grupo controle. A Figura 35B apresenta a resposta de um jovem com DMD *upstream* 30. As Figuras 35C e 35D apresentam os resultados de dois jovens com DMD *downstream* 30.

Os valores de amplitude e os tempos implícitos estão apresentados na Figura 36 através dos resultados individuais de controles e jovens com DMD. Cada ponto representa o tempo implícito no eixo X e a amplitude da resposta no eixo Y para a onda-d.

O pico da onda-d ocorreu entre 13 e 31 ms (média = $24,6 \pm 3,9$ ms) após a apresentação do estímulo e a amplitude variou de 22,7 a 143,7 μ V (média = $61,7 \pm 36,9$ μ V) para o grupo controle.

A Figura 37 mostra a média e o desvio padrão dos controles e os resultados individuais de jovens com DMD para a amplitude (acima) e tempo implícito (abaixo) da onda-d do ERG fotópico OFF.

Figura 35. ERG fotópico OFF. Resposta de um sujeito representativo do grupo controle (A), e respostas de três jovens com DMD: um jovem *upstream* 30 (B) e dois jovens *downstream* 30 (C e D). Abaixo está representada a modulação temporal da luminância do estímulo em forma de dente de serra.

Figura 36. ERG fotópico OFF. Amplitude e tempo implícito para os controles (n=30; quadrados cinza); dois jovens com DMD *upstream* 30 (círculos vazios); jovens com DMD *downstream* 30 (círculos cheios). Observe que as amplitudes acima de 100 µV são resultados de quatro sujeitos do grupo controle mais jovens (idades entre 8 e 12 anos).

A amplitude da onda-d apresentou-se reduzida para os jovens com DMD em relação ao grupo controle, entretanto não houve diferença significativa entre os resultados de jovens com DMD *downstream* 30 e o grupo controle ($p > 0,05$). O tempo implícito da onda-d foi semelhante para todos os sujeitos ($p > 0,05$). A tabela 10 apresenta os resultados numéricos de amplitude e tempo implícito do ERG fotópico OFF de controles e jovens com DMD.

- Média (desvio padrão) dos controles (N = 30)
- DMDs *upstream* 30 (N = 2)
- DMDs *downstream* 30 (N = 8)

Figura 37. Amplitude (acima) e tempo implícito (abaixo) da onda-d do ERG fotópico OFF. Quadrado: média $\pm$ um desvio padrão dos resultados dos controles; círculos vazios: resultados de dois DMDs *upstream* 30; círculos cheios: resultados de DMDs *downstream* 30. Não houve diferença estatística significativa entre jovens com DMD e controles para a amplitude e o tempo implícito. Observe que há sobreposição dos pontos no gráfico do tempo implícito.

Tabela 10. Resultados de amplitude e tempo implícito do ERG fotópico OFF para o grupo controle e para os jovens com DMD.

onda-d	Amplitude (µV)	Tempo Implícito (ms)
Controles (N = 30)	61,7 $\pm$ 36,9	24,6 $\pm$ 3,9
DMDs <i>upstream</i> 30 (N = 2)	15,9 e 31,9	24 e 24
DMDs <i>downstream</i> 30 (N = 8)	36,8 $\pm$ 13,1	23,9 $\pm$ 1,1
valor de p^*	> 0,05	> 0,2

*Mann-Whitney U Test, comparação entre controles e DMDs *downstream* 30.

4.1.7 Correlações

O teste estatístico de correlação de *Spearman* mostrou que há efeito da idade para o tempo implícito da onda-b tanto do ERG fotópico como do ERG fotópico ON ($r^2 = 0,5$ e $p < 0,05$) nos resultados do grupo controle (Figura 38A e 38B). Além disso, o mesmo efeito foi encontrado para a amplitude da onda-b do ERG mesópico OFF ($r^2 = 0,4$ e $p < 0,05$) também nos resultados do grupo controle (Figura 38C).

No caso do tempo implícito da onda-b de ambos os ERGs fotópicos, houve uma correlação negativa com a idade, isso significa que quanto mais novo o sujeito mais atrasada a resposta, considerando a faixa etária avaliada no presente estudo (8 a 29 anos). No caso da onda-b do ERG mesópico OFF, a correlação também foi negativa, isso significa que quanto mais jovem o sujeito maior a amplitude de resposta para a mesma faixa etária.

Para os jovens com DMD, não houve correlação significativa dos resultados do ERG com a idade ($p > 0,05$), com os resultados do QI ($p > 0,05$) ou com o tempo de uso de corticóides ($p > 0,05$).

Considerando que as amplitudes da onda-b (ERG escotópico, fotópico, mesópico ON, mesópico OFF e fotópico ON) e da onda-d (ERG fotópico OFF) foram os parâmetros que apresentaram as alterações mais significativas nos jovens com DMD, foi realizada a comparação entre a região de alteração genética no gene da distrofina indicando se o resultado para cada protocolo de cada jovem com DMD encontra-se dentro dos limites esperados (N) ou abaixo dos limites esperados (A). Os limites normais foram calculados a partir da média $\pm$ um desvio padrão dos resultados dos controles (Figura 39).

Para o ERG escotópico todos os jovens com DMD apresentaram redução da onda-b, independentemente da alteração genética. Praticamente o mesmo ocorreu para o ERG fotópico, considerando que quase todos os jovens apresentaram a onda-b reduzida, com exceção de um jovem *downstream* 30, que apresentou a amplitude dentro do normal, mas muito próxima do limite inferior dos controles.

No ERG mesópico ON, apenas dois dos 10 jovens avaliados apresentaram a amplitude da onda-b dentro do esperado, um jovem *downstream* 30 e outro *upstream* 30, e no ERG mesópico OFF, quatro jovens apresentaram amplitude da onda-b dentro do esperado: dois jovens *downstream* 30 e os dois jovens *upstream* 30.

Por fim, apenas um jovem com DMD *downstream* 30 apresentou a amplitude da onda-b do ERG fotópico ON dentro do esperado, este foi o mesmo jovem que apresentou a onda-b do ERG fotópico também normal. Entretanto sete dos 10 jovens com DMD avaliados apresentaram o ERG fotópico OFF normal. Entre os jovens que apresentaram a redução da amplitude da onda-d dois possuem alteração genética *downstream* 30 e um possui alteração genética *upstream* 30.

A comparação dos resultados com a localização da alteração genética mostra que os ERGs escotópico, mesópicos e fotópicos encontram-se alterados tanto em jovens com DMD *downstream* 30 como em jovens com DMD *upstream* 30 (considerando que apenas dois jovens *upstream* 30 foram avaliados no presente estudo).

Figura 38. Gráficos de correlação da idade com os resultados do ERG do grupo controle. Houve correlação negativa para o tempo implícito da onda-b tanto do ERG fotópico (A) como do ERG fotópico ON (B). Além disso, houve correlação negativa entre a idade e a amplitude da onda-b do ERG mesópico OFF (C).

Figura 39. Região de alteração no gene da distrofina para cada jovem com DMD avaliado (esquerda) e resultado normal (N) ou alterado (A) para as amplitudes da onda-b (ERG escotópico, fotópico, mesópico ON, mesópico OFF e fotópico ON) e da onda-d (ERG fotópico OFF). No ERG escotópico todos os jovens apresentaram onda-b alterada e no ERG fotópico apenas um jovem com DMD *downstream* 30 apresentou a onda-b normal. Os tracinhos indicam que dois jovens não realizaram os protocolos do ERG de flash. Nos protocolos mesópicos, dois jovens, um *downstream* 30 e outro *upstream* 30 apresentaram onda-b normal e quatro jovens, entre eles os dois jovens *upstream* 30 apresentaram onda-b do ERG mesópico OFF normal. No ERG fotópico ON apenas um jovem *downstream* 30 apresentou onda-b normal e no ERG fotópico OFF sete dos 10 jovens com DMD avaliados apresentaram a onda-d normal.

4.2 Avaliação Psicofísica

Os resultados da avaliação psicofísica serão apresentados em quatro subtópicos, um para cada teste utilizado: teste do xadrez, teste de sensibilidade ao contraste espacial de luminância, teste de sensibilidade ao contraste temporal de luminância e, por último, haverá um subtópico dedicado às análises de correlação dos resultados com a idade de controles e jovens com DMD, com o quociente de inteligência (QI), o tempo de uso de corticóides e os resultados genéticos dos jovens com DMD.

4.2.1 Teste do Xadrez

Para o grupo controle os valores de sensibilidade ao contraste variaram entre 16,5 e 80,7 (média = $33,5 \pm 16,1$) para o protocolo magno-ON e entre 17,6 e 177 (média = $72,7 \pm 35,8$) para o protocolo magno-OFF. Para os protocolos parvo, os valores de sensibilidade foram mais elevados, variaram de 23,6 a 168 (média = 65 ± 32) para o protocolo parvo-ON e de 65,6 a 256 (média = $137,7 \pm 50$) para o protocolo parvo-OFF.

A Tabela 11 apresenta os resultados médios do grupo controle e dos jovens com DMD para os quatro protocolos utilizados: magno-ON, magno-OFF, parvo-ON e parvo-OFF. A Figura 40 mostra que houve diferença estatística significativa para a sensibilidade ao contraste positivo (estímulo branco sobre o fundo cinza) entre controles e jovens com DMD em ambos os protocolos, magno e parvo ($p < 0,05$).

Figura 40. Resultados de sensibilidade ao contraste positivo (acima) e negativo (abaixo) do teste do xadrez. Quadrado: média $\pm$ um desvio padrão dos resultados dos controles; círculos abertos: resultados de dois DMDs *upstream* 30; círculos cheios: resultados de 17 DMDs *downstream* 30. Os jovens com DMD apresentaram limiares reduzidos em comparação aos controles. A diferença foi significativa para os protocolos magno-ON (acima e à esquerda) e parvo-ON (acima e à direita). *diferença estatisticamente significativa entre controles e DMDs *downstream* 30.

A Figura 41 mostra os resultados individuais de todos os sujeitos normalizados pela média dos controles para os protocolos magno-ON e parvo-ON nos quais houve redução significativa da sensibilidade ao contraste para os jovens com DMD em relação aos controles. Observe que a maioria dos jovens com DMD apresenta resultados abaixo da média dos controles.

□ Controles (N = 40) ● DMDs *downstream* 30 (N = 17)
 ○ DMDs *upstream* 30 (N = 2)

Figura 41. Resultados de sensibilidade ao contraste normalizados pela média do grupo controle para os dois protocolos do xadrez nos quais houve redução estatística para os resultados dos jovens com DMD. Resultados abaixo da linha pontilhada representam sensibilidade reduzida em relação à média dos controles.

Tabela 11. Resultados de sensibilidade ao contraste do teste do xadrez de controles e jovens com DMD.

Teste do Xadrez	Magno		Parvo	
	ON	OFF	ON	OFF
Controles (N = 40)	33,5 ± 16,1	72,7 ± 35,8	65 ± 32	137,7 ± 50
DMDs <i>upstream</i> 30 (N = 2)	50,2 e 19,9	84,4 e 87,2	55 e 52,9	181 e 177
DMDs <i>downstream</i> 30 (N = 17)	22,7 ± 11,6	73,1 ± 28,7	43,4 ± 28,8	115,1 ± 48,4
valor de <i>p</i> *	< 0,01	> 0,9	< 0,01	> 0,3

*Mann-Whitney *U* Test, comparação entre controles e DMDs *downstream* 30.

4.2.2 Sensibilidade ao Contraste Espacial de Luminância

Para o grupo controle os valores da sensibilidade ao contraste espacial de luminância variaram entre 16,4 e 71,8 (média = $38,7 \pm 14,2$) em 0,4 cpg; entre 49,8 e 294 (média = $129,5 \pm 52,7$) em 1,6 cpg; entre 52 e 259 (média = $128,6 \pm 41,7$) em 6,2 cpg; e entre 15,7 e 88,3 (média = $46,4 \pm 15,6$) em 12,5 cpg.

A Tabela 12 apresenta os resultados médios do grupo controle e dos jovens com DMD para as quatro frequências espaciais utilizadas. A Figura 42 mostra que houve diferença estatística significativa para a sensibilidade ao contraste espacial de luminância entre controles e jovens com DMD nas duas frequências espaciais mais altas: 6,2 cpg e 12,5 cpg ($p < 0,05$).

A Figura 43 mostra os resultados individuais de todos os sujeitos normalizados pela média dos controles para as frequências espaciais nas quais os jovens com DMD apresentaram redução significativa da sensibilidade ao contraste: 6,2 cpg e 12,5 cpg. Observe que a maioria dos jovens com DMD apresenta resultados abaixo da média dos controles, ou seja, abaixo de 1.

Figura 42. Resultados de sensibilidade ao contraste espacial de luminância. Quadrado: média $\pm$ um desvio padrão dos resultados dos controles; círculos vazios: resultados de dois DMDs *upstream* 30; círculos cheios: resultados de 17 DMDs *downstream* 30. Os jovens com DMD apresentaram sensibilidade reduzida em comparação aos controles e essa diferença foi significativa para as frequências espaciais 6,5 cp/g (acima e à direita) e 12,5 cp/g (abaixo e à direita). *diferença estatisticamente significativa entre controles e DMDs *downstream* 30.

Figura 43. Resultados de sensibilidade ao contraste normalizados pela média do grupo controle para as duas frequências espaciais de luminância nas quais houve redução estatística para os jovens com DMD. Resultados abaixo da linha pontilhada representam sensibilidade reduzida em relação à media dos controles.

Tabela 12. Resultados de sensibilidade ao contraste espacial de luminância de controles e jovens com DMD.

Sensibilidade ao Contraste Espacial de Luminância	Frequência Espacial			
	0,4 cpg	1,6 cpg	6,2 cpg	12,5 cpg
Controles (N = 40)	38,7 ± 14,2	129,5 ± 52,7	128,6 ± 41,7	46,4 ± 15,6
DMDs <i>upstream</i> 30 (N = 2)	21,2 e 36,8	121 e 98,5	105 e 81,9	30,6 e 37
DMDs <i>downstream</i> 30 (N = 17)	37,3 ± 24	100,7 ± 50,3	64,7 ± 44,3	25,6 ± 17,1
valor de <i>p</i> *	> 0,2	> 0,1	< 0,01	< 0,01

*Mann-Whitney *U* Test, comparação entre controles e DMDs *downstream* 30.

4.2.3 Sensibilidade ao Contraste Temporal de Luminância

Para o grupo controle os valores da sensibilidade ao contraste temporal de luminância variaram entre 7,2 e 88 (média = $19,7 \pm 16,8$) em 2,5 Hz; entre 12,9 e 93,9 (média = $31,8 \pm 17,9$) em 5 Hz; entre 16,6 e 88,1 (média = $38,7 \pm 14,3$) em 10 Hz; e entre 11,5 e 98,6 (média = $28,3 \pm 18$) em 20 Hz.

A Tabela 13 apresenta os resultados médios do grupo controle e dos jovens com DMD para os quatro frequências temporais utilizadas. A Figura 44 mostra que os resultados de sensibilidade ao contraste temporal de luminância de controles e jovens com DMD foram semelhantes para três frequências temporais testadas: 2,5 Hz ($p > 0,05$), 5 Hz ($p > 0,05$), 10 Hz ($p > 0,05$), com exceção da frequência temporal mais alta: 20 Hz ($p < 0,05$).

A Figura 45 mostra os resultados individuais de todos os sujeitos normalizados pela média dos controles para a frequência temporal na qual os jovens com DMD apresentaram redução significativa da sensibilidade ao contraste: 20 Hz. Observe que a maioria dos jovens com DMD apresenta resultados abaixo da média dos controles, ou seja, abaixo de 1.

Figura 44. Resultados de sensibilidade ao contraste temporal de luminância. Quadrado: média $\pm$ um desvio padrão dos resultados dos controles; círculos vazios: resultados de dois DMDs *upstream* 30; círculos cheios: resultados de 17 DMDs *downstream* 30. Os jovens com DMD apresentaram sensibilidade reduzida em comparação aos controles para a frequência temporal de 20 Hz. *diferença estatisticamente significativa entre controles e DMDs *downstream* 30.

Figura 45. Resultados de sensibilidade ao contraste normalizados pela média do grupo controle para o protocolo do contraste temporal de luminância no qual houve redução estatística para os jovens com DMD. Resultados abaixo da linha pontilhada representam sensibilidade reduzida em relação à media dos controles.

Tabela 13. Resultados de sensibilidade ao contraste temporal de luminância de controles e jovens com DMD.

Sensibilidade ao Contraste Temporal de Luminância	Frequência Temporal			
	2,5 Hz	5 Hz	10 Hz	20 Hz
Controles (N = 40)	19,7 ± 16,8	31,8 ± 17,9	38,7 ± 14,3	28,3 ± 18
DMDs <i>upstream</i> 30 (N = 2)	15 e 14,6	32,8 e 29	66,3 e 39,6	47,1 e 24,4
DMDs <i>downstream</i> 30 (N = 17)	15,7 ± 10,2	27,8 ± 18,8	30,2 ± 18,3	18 ± 12,4
valor de <i>p</i> *	> 0,2	> 0,2	> 0,05	< 0,01

**Mann-Whitney U Test*, comparação entre controles e DMDs *downstream* 30.

4.2.4 Correlações

O teste estatístico de correlação de *Spearman* mostrou que há efeito da idade para o teste do xadrez (Figura 46). Para os protocolos magno-ON e parvo-ON ($r^2 = 0,3$ e $p < 0,05$) as correlações foram negativas, isso significa que quanto mais jovem o sujeito melhor a sua sensibilidade ao contraste. Por outro lado, quanto mais jovem o sujeito pior a sensibilidade para os protocolos do contraste negativo, considerando que houve correlação positiva para os protocolos magno-OFF ($r^2 = 0,5$ e $p < 0,05$) e parvo-OFF ($r^2 = 0,4$ e $p < 0,05$).

Além disso, houve correlação negativa significativa entre a idade e a sensibilidade ao contraste de luminância para o grupo controle nas frequências espaciais mais baixas: 0,4 cp/g ($r^2 = 0,3$ e $p < 0,05$) e 1,6 ($r^2 = 0,4$ e $p < 0,05$), e na frequência temporal mais baixa: 2,5 Hz ($r^2 = 0,4$ e $p < 0,05$), indicando que a sensibilidade ao contraste para esses protocolos é melhor em sujeitos mais jovens (Figura 47).

Para os jovens com DMD, não houve correlação significativa dos resultados dos testes psicofísicos com a idade ($p > 0,05$), com os resultados do QI ($p > 0,05$) ou com o tempo de uso de corticóides ($p > 0,05$).

Figura 46. Gráficos de correlação da idade com os resultados do teste do xadrez do grupo controle. Houve correlação negativa para os protocolos magno-ON e parvo-ON (A e B) e houve correlação positiva para os protocolos magno-OFF e parvo-OFF (C e D).

Figura 47. Gráficos de correlação da idade com os resultados dos testes de sensibilidade ao contraste espacial e temporal de luminância do grupo controle. Houve correlação negativa para as duas frequências espaciais mais baixas (A e B) e para a frequência temporal mais baixa (C).

A Figura 48 permite comparar, para cada jovem com DMD, a região de alteração genética no gene da distrofina e o resultado para cada protocolo indicando se este encontra-se dentro dos limites esperados (N) ou abaixo dos limites esperados (A). Os limites normais foram calculados a partir da média $\pm$ um desvio padrão dos resultados dos controles.

Para os protocolos do contraste positivo (magno-ON e parvo-ON), seis e oito jovens com DMD, respectivamente, apresentaram sensibilidade abaixo do limite inferior, todos *downstream* 30.

No teste de sensibilidade ao contraste espacial de luminância, 13 dos 20 jovens com DMD apresentaram resultados abaixo do limite inferior para, ao menos, uma frequência espacial. No teste de sensibilidade ao contraste temporal de luminância, seis dos 20 jovens com DMD apresentaram resultados abaixo do limite inferior para, ao menos, uma frequência temporal, todos *downstream* 30.

A comparação dos resultados com a localização da alteração genética mostra que a sensibilidade ao contraste positivo e a sensibilidade ao contraste temporal de luminância está reduzida em jovens com DMD *downstream* 30, e que a sensibilidade ao contraste espacial de luminância pode estar alterada em jovens com DMD *upstream* 30. Entretanto, isto precisaria ser confirmado com a avaliação de um número maior de sujeitos com alteração genética *upstream* 30.

Figura 48. Região de alteração no gene da distrofina para cada jovem com DMD avaliado (esquerda) e resultado normal (N) ou alterado (A) para a sensibilidade ao contraste positivo (magno-ON e parvo-ON) e para a sensibilidade ao contraste espacial e temporal de luminância. No protocolo magno-ON, seis dos 19 jovens com DMD apresentaram sensibilidade abaixo da linha inferior e no protocolo parvo-ON, oito dos 19 jovens. Ambos os jovens *upstream* 30 apresentaram resultados dentro dos limites esperados. Para o teste de sensibilidade ao contraste espacial de luminância, 13 jovens apresentaram sensibilidade abaixo do limite inferior dos controles em, ao menos, uma das frequências espaciais avaliadas. Observe que um dos jovens é *upstream* 30. Para o teste de sensibilidade ao contraste temporal de luminância, seis jovens apresentaram sensibilidade abaixo do limite inferior dos controles em, ao menos, uma das frequências temporais avaliadas. Os dois jovens *upstream* 30 apresentaram resultados dentro do esperado para o teste de sensibilidade ao contraste temporal de luminância.

5. Discussão

A retina é um tecido com alto nível de expressão da distrofina, entretanto, diferentes isoformas da distrofina parecem possuir diferentes funções como, por exemplo, na comunicação sináptica (Pillers, 1999). A retina possui células neuronais e não neuronais que trabalham juntas para garantir o processamento visual e a homeostase do tecido retiniano (para revisão: Joselevitch, 2008). A distrofina é expressa na retina tanto por células neuronais como por células não neuronais (Blake & Kröger, 2000). O presente estudo confirma os resultados anteriores (Pillers et al., 1993; 1999a; Fitzgerald et al., 1994; 1998; 1999; Cibis et al., 2001) que mostraram que a disfunção da distrofina altera a fisiologia da retina, provocando prejuízos severos no ERG de campo total de jovens com DMD, sem causar prejuízos à acuidade visual dos pacientes.

A avaliação da visão na DMD além de permitir estudar o papel da distrofina na fisiologia da retina, também possibilita estudar as consequências de sua disfunção para a visão. Trata-se de uma condição rara entre as alterações retinianas, na qual não existe qualquer sintoma oftalmológico, entretanto o ERG encontra-se profundamente alterado. Além disso, prejuízos subclínicos em funções visuais também estão presentes. Essa condição ocorre porque a distrofina é expressa por subpopulações de neurônios e localiza-se em subclasses de sinapses (Wersinger et al., 2011).

5.1 Avaliação eletrofisiológica

No presente estudo, os resultados do ERG de campo total mostraram que jovens com DMD apresentam alterações em respostas retinianas escotópicas, mesópicas e fotópicas. No presente estudo foram utilizados os protocolos com modulação da luminância em forma de dente de serra para estimular, preferencialmente, a atividade de mecanismos ON e OFF da retina que respondem, respectivamente, ao aumento e à diminuição da luminância média na qual o sistema encontra-se adaptado (Hanly & Mackay, 1979; Schiller, 1992; Schiller, 1995). Foi observada alteração assimétrica nos mecanismos visuais ON e OFF nas respostas fotópicas da retina.

5.1.1 O ERG de flash na DMD

No presente estudo, todos os jovens com DMD avaliados com o ERG escotópico ($n = 8$) apresentaram a onda-b reduzida ($n = 6$) ou ausente ($n = 2$). Considerando que as amplitudes da onda-b apresentaram-se ainda mais reduzidas nos jovens com DMD *downstream* 30 (quando não ausentes) foi difícil medir com precisão o tempo implícito desse componente. Os dois jovens que apresentaram a onda-b ausente possuem alteração genética *downstream* 30. Em 1993, Pillers et al. mostraram que a distrofina é essencial para a geração da onda-b do ERG escotópico ao encontrarem redução ou ausência desse componente nos seis jovens com DMD que avaliaram. Quatro dos seis jovens apresentavam deleção genética *downstream* 30 e dois dos seis jovens apresentavam alteração genética não detectável. Esses dois jovens

provavelmente possuíam alguma mutação de ponto no gene da distrofina que dificilmente poderia ser encontrada através dos exames genéticos disponíveis na época. Ao mesmo tempo, Cibis et al. (1993) mostravam alterações na amplitude da onda-b do ERG escotópico em cinco jovens com DMD, dos quais quatro apresentavam alteração genética *downstream* 30 e um apresentava alteração genética não detectável.

No ano seguinte, DeBecker et al. (1994) publicaram os resultados do ERG de campo total de 14 jovens que possuíam as características fenotípicas da DMD. Os resultados mostraram que 50% dos jovens apresentaram a amplitude da onda-b do ERG escotópico reduzida, dos quais cinco apresentavam alteração genética *downstream* 30, um apresentava alteração genética *upstream* 30 e um não realizou a avaliação genética. Os outros sete jovens que apresentaram o ERG escotópico normal, não realizaram a avaliação genética ou apresentavam alteração genética não detectável. Os autores justificaram os resultados sugerindo que os pacientes que apresentaram o ERG escotópico normal poderiam possuir uma mutação genética que não estaria afetando as isoformas retinianas da distrofina ou, ainda, que esses jovens possuíam outro tipo de distrofia muscular que não estaria relacionada com a alteração da distrofina, ou seja, poderiam não ser jovens com DMD.

Tradicionalmente, a onda-b do ERG escotópico é atribuída à despolarização das células bipolares ON provocada pela estimulação dos bastonetes (Stockton & Slaughter, 1989; Gurevich & Slaughter, 1993; Sieving, 1993). Existe ainda a hipótese de que a onda-b do ERG escotópico estaria relacionada à regulação homeostática do potássio pelas células gliais de Müller

através de tamponamento espacial por sifonamento. Estas células gliais possuem importante papel no equilíbrio dos níveis iônicos extracelulares constantemente modificados pela atividade dos neurônios retinianos (Miller & Dowling, 1970; Newman & Odette, 1984). Dessa maneira, a onda-b do ERG seria influenciada, indiretamente, pela atividade das células bipolares ON.

Atualmente sabe-se que as células de Müller contribuem pouco para a onda-b do ERG de campo total (Hood & Birch, 1996). Recentemente, Thompson et al. (2011) mostraram que pacientes com a síndrome de EAST, que possuem mutação do gene KCNJ10 responsável pela expressão dos canais Kir4.1, apresentam aumento no tempo implícito da onda-b do ERG escotópico sem prejuízos à amplitude da resposta. O presente estudo concorda com a hipótese de que a alteração da onda-b do ERG escotópico na DMD estaria relacionada à comunicação sináptica entre fotorreceptores e células bipolares e não devido à contribuição indireta do equilíbrio iônico promovido pelas células de Müller. Todos os jovens com DMD avaliados no presente estudo possuem alteração genética anterior ao exon 63 (promotor da isoforma Dp71), ou seja, nesses jovens a isoforma Dp71 encontra-se preservada. Além disso, o ERG escotópico não se encontra alterado no modelo *Dp71-null mice* que possui a Dp71 ausente (Cia et al., 2010).

A hipótese de alteração do ERG escotópico em jovens com DMD causada pela disfunção na comunicação sináptica entre bastonetes e células bipolares ON é apoiada por trabalhos que mostraram a distrofina nas regiões invaginadas dos terminais sinápticos dos fotorreceptores (Brake & Kröger, 2000; Drenckhahn et al., 1996; Schmitz & Drenckhahn, 1997a; Ueda et al., 1998; Ueda et al., 2000b; Ueda et al., 1997a e b). Outros trabalhos que

mostraram redução da onda-b do ERG escotópico em jovens com DMD (Cibis et al., 1993; Pillers et al., 1993; Girlanda et al., 1997; Pascual-Pascual et al., 1998; presente estudo) associados aos trabalhos que mostraram resultados semelhantes nos modelos animais com ausência de isoformas menores da distrofina (Pillers et al., 1995; D'Souza et al., 1995; Green, Guo, & Pillers, 2004) sugerem que a distrofina possui de fato um papel importante na comunicação sináptica entre bastonetes e células bipolares.

Há quase duas décadas, a redução da amplitude de resposta da onda-b do ERG escotópico em jovens com DMD foi considerada a condição não muscular mais característica da doença (Pillers et al., 1993). Além disso, ficou fortemente estabelecido que essa alteração não está relacionada à CSNB porque os jovens com DMD apresentam adaptação ao escuro normal (DeBecker et al., 1993), acuidade visual normal e não possuem queixas visuais, como nos resultados do presente estudo. Os pesquisadores observaram também as respostas iniciadas pelos cones no ERG de campo total de jovens com DMD. Embora ambos os estudos citados anteriormente (Pillers et al., 1993; DeBecker et al., 1994) tenham mostrado respostas fotópicas semelhantes à de jovens controles, Cibis et al. (1993) e Fitzgerald et al. (1994) mostraram ausência do segundo potencial oscilatório (PO2) na resposta fotópica de jovens com DMD.

No presente estudo, de fato, a onda-a do ERG fotópico foi semelhante entre jovens com DMD e controles. Entretanto, a onda-b apresentou amplitude reduzida. A onda-a do ERG fotópico parece representar, predominantemente, a atividade inicial dos cones em resposta ao flash de luz, enquanto a onda-b representaria a soma de atividades das células bipolares ON e OFF (que

estariam separadas em dois componentes, onda-b e onda-d, no ERG com flash de longa duração), iniciadas pelos cones (Bush & Sieving, 1994). No caso dos jovens com DMD, a redução na amplitude da onda-b do ERG fotópico mostrada anteriormente (Fitzgerald et al., 1994; Costa, 2004) foi confirmada pelo presente estudo.

As amplitudes dos POs seguiram a mesma tendência de redução da onda-b, para todos os jovens avaliados que apresentaram respostas detectáveis, mas sem prejuízos para o tempo implícito desses componentes, concordando com os resultados anteriores de Costa (2004). Além disso, a ausência do PO2 ocorreu em metade dos jovens com DMD avaliados, entretanto a mesma condição foi encontrada em cinco dos 30 voluntários saudáveis avaliados. No presente estudo, os POs foram avaliados no domínio do tempo no registro do ERG fotópico, como fizeram Fitzgerald et al. (1994). As origens celulares dos POs fotópicos permanecem desconhecidas (Lachapelle, 2006). Acredita-se que sejam origens diferentes das associadas à onda-b do ERG fotópico. Possivelmente, os POs representam atividades inibitórias de diferentes circuitos retinianos (Wachtmeister, 1980). Algumas alterações retinianas que afetam tanto o sistema de cones (distrofia de cones: Lachapelle et al., 1998) como o sistema de bastonetes (CSNB: Lachapelle, Little & Polomeno, 1983) comprometem os POs fotópicos. Entretanto, não se sabe porque o PO2 ausente pode ser encontrado inclusive em sujeitos saudáveis (Weleber & Eisner, 1988, a partir de Cibis et al., 1993).

Para o nosso conhecimento, o presente estudo é o primeiro a analisar os resultados da resposta fotópica negativa (RFN) em jovens com DMD. A RFN parece refletir a atividade da retina interna, ou seja, a atividade das células

amácrinas e ganglionares (Viswanathan, Frishman, Robson, Harwerth, Smith III, 1999). Entretanto, é preciso considerar que o ERG de campo total é gerado por uma mudança complexa do potencial retiniano que ocorre devido à apresentação de um flash rápido. Nesse contexto, seria interessante avaliar nessa população o ERG de padrão (PERG) cujas respostas dependem da integridade de neurônios da retina interna (Maffei, Fiorentini, Bisti, & Hollander, 1985; Viswanathan, Frishman & Robson, 2000). O fato é que parece haver uma alteração na resposta que representa a retina interna em jovens com DMD, resultante de alterações anteriores na comunicação sináptica entre fotorreceptores e células bipolares ou de alterações dos próprios grupos celulares da retina interna.

Outra evidência de prejuízo na visão fotópica em jovens com DMD, é a alteração do ERG em resposta a flicker de 30 Hz. Embora alguns trabalhos (Cibis et al., 1993; Pillers et al., 1993; De Becker et al., 1994) mostrem respostas normais para o flicker de 30 Hz, Fitzgerald et al. (1994) mostraram que jovens com DMD, apesar de apresentarem amplitudes de resposta normais, possuem respostas em formato de dente de serra, alteração que, segundo os autores, estaria relacionada com uma disfunção assimétrica dos mecanismos ON e OFF da retina. Os autores consideraram que a resposta ao flicker de 30 Hz representaria uma mistura da atividade de células bipolares ON e OFF mediadas pelos cones. Costa (2004) também mostrou que o ERG para flicker 30 Hz em jovens com DMD apresenta uma mudança de fase da resposta, apesar da amplitude normal.

5.1.2 O ERG ON e OFF na DMD

Fitzgerald et al. (1994) encontraram a onda-b reduzida, mas presente, e a onda-d normal em jovens com DMD para o protocolo do ERG fotópico com flash de longa duração, indicando alteração da via ON. Além de confirmar os achados de Fitzgerald et al. (1994), o presente estudo obteve resultados do ERG de campo total para avaliação com estímulos ON e OFF em nível mesópico (1 cd/m^2), ou seja, respostas iniciadas principalmente pelos bastonetes.

O ERG mesópico ON apresentou uma onda bifásica com um componente negativo (onda-a) seguido por um componente positivo (onda-b) de maior amplitude, e o ERG mesópico OFF apresentou uma onda em forma de senóide cujo pico positivo foi chamado de onda-b. Os jovens com DMD apresentaram o ERG mesópico alterado: onda-a atrasada, onda-b reduzida e atrasada em alguns casos, e onda-b do ERG mesópico OFF reduzida. Os resultados mostraram que em níveis mesópicos jovens com DMD apresentam alterações nas respostas de protocolos que estimulam ambas as vias ON e OFF da retina. Isso significa que, quando os bastonetes estão ativos e dominam a resposta, ambos os tipos de estimulação, ON e OFF, geram respostas alteradas em jovens com DMD.

Prejuízos na visão mesópica também são encontrados em algumas alterações retinianas como, por exemplo, a retinose pigmentar e a CSNB (Petzold & Plant, 2006). Apesar da visão fotópica ser utilizada na maior parte do tempo que usamos o nosso sistema visual, a visão mesópica é importante para várias tarefas cotidianas, especialmente noturnas ou em ambientes com

baixa iluminação. Além disso, sinais de bastonetes são projetados para circuitos neurais que também transmitem sinais dos cones, ou seja, há comunicação direta entre bastonetes e cones através de sinapses elétricas (Schneeweis & Schnapf, 1995), implicando que ambos os sistemas contribuem para o mesmo conjunto de processos visuais que mediam a visão espacial, a resolução temporal, e outras funções visuais.

Os resultados aqui apresentados mostram que para o protocolo fotópico ON, os jovens com DMD apresentam atenuação significativa da amplitude de resposta da onda-b, sem prejuízos para a onda-a, e para o protocolo fotópico OFF os jovens com DMD apresentam atenuação da amplitude de resposta sem diferença estatística significativa na comparação com o grupo controle. Os resultados confirmam a investigação preliminar de Fitzgerald et al. (1994) que sugere prejuízos para a via ON dos cones em jovens com DMD decorrentes de alterações na comunicação sináptica entre fotorreceptores e células bipolares ON. Green et al. (2004) estudaram o ERG através de registros da retina isolada em camundongos mdx^{3Cv} e controles e concluíram que a alteração do ERG encontrada em jovens com DMD estaria, de fato, relacionada à alteração na transmissão sináptica entre os fotorreceptores e as células bipolares ON.

As origens retinianas do ERG fotópico com flash de longa duração são investigadas por diversos grupos em estudos que utilizam bloqueio farmacológico (Sieving, 1993), assim como em alterações que afetam os mecanismos ON e OFF da retina de forma assimétrica (Sieving, 1993). As respostas para os protocolos do ERG fotópico com modulação em dente de serra são semelhantes àsquelas encontradas no protocolo do ERG com flash de longa duração. O ERG fotópico com flash de longa duração foi estudado em

jovens com DMD por Fitzgerald et al. (1994), entretanto, até onde sabemos, o presente estudo é o primeiro a avaliar, em jovens com DMD, o ERG de campo total com os protocolos em dente de serra (ON e OFF).

Ao contrário do ERG fotópico com flash de longa duração, o protocolo em dente de serra permite avaliar respostas iniciadas por bastonetes e cones. Chen, Zuo, Piao, & Miyake (2005) mostraram que o protocolo para o estímulo de longa duração (200 ms) em níveis mesópicos de luminância ($1,3 \text{ cd/m}^2$) não é apropriado para medir respostas ON e OFF. A resposta para esse protocolo apresenta um componente negativo (onda-a), seguido por um componente positivo (onda-b) que ocorre mais lentamente que a resposta para o ERG fotópico com estímulo de longa duração. Entretanto, o segundo componente positivo, que é observado no mesmo protocolo com a estimulação fotópica, não é observado na estimulação mesópica. Os autores explicam que as respostas iniciadas, predominantemente, por bastonetes ocorrem mais lentamente e, por isso, a resposta “OFF” estaria suprimida pela resposta “ON” nesse tipo de avaliação. O protocolo com modulação da luminância em dente de serra seria uma alternativa para medir as atividades ON e OFF no ERG de campo total em níveis mais baixos de luminância (Chen et al., 2005). Entretanto, não está claro o quanto a resposta “OFF” também estaria suprimida pela resposta “ON” (que ocorre devido ao aumento lento da luminância) na estimulação em dente de serra.

No presente estudo a luminância de 1 cd/m^2 foi escolhida porque o sistema eletrofisiológico utilizado não permitia níveis de luminância mais baixos para modulação em dente de serra. Recentemente, um estudo mostrou que as respostas do ERG de campo total são dominadas pelos sinais dos bastonetes

em níveis mesópicos (luminância média = $1,3 \text{ cd/m}^2$), após adaptação ao escuro, para frequências temporais entre 2 e 8 Hz (Cao, Pokorny & Grassi, 2011). Dessa maneira, podemos considerar que o protocolo mesópico utilizado no presente estudo (luminância média = 1 cd/m^2 , frequência temporal = 4 Hz e adaptação ao escuro) reflete uma resposta com maior contribuição do sistema de bastonetes. Isso explicaria, em parte, porque o formato da onda é completamente diferente para as respostas mesópicas e fotópicas tanto para os protocolos ON, mas, especialmente, para os protocolos OFF. A diferença entre as respostas para os protocolos OFF em níveis mesópico e fotópico também poderia estar relacionada à ausência de uma célula ganglionar OFF específica para a via dos bastonetes (Daw, Jensen, & Brunken, 1990; Wässle, Yamashita, Greferath, Grünert, & Müller, 1991).

Os bastonetes possuem contatos diretos com as células bipolares OFF dos cones, entretanto este circuito adicional dos bastonetes é de baixa sensibilidade, ou seja, parece funcionar em níveis mais altos de intensidade de luz quando o sistema não está totalmente adaptado ao escuro (Völgyi et al., 2004). Os bastonetes utilizam, como via principal, um circuito indireto de alta sensibilidade cujos sinais são enviados para as células ganglionares ON e OFF através do circuito de células amácrinas AII e células bipolares ON e OFF dos cones (Dacheux & Raviola, 1986).

Não foram encontrados trabalhos mostrando as respostas para os protocolos do ERG com modulação em dente de serra para níveis mesópicos usando bloqueios farmacológicos de determinados grupos celulares da retina. Da mesma maneira, não foram encontrados trabalhos mostrando esse tipo de avaliação em pacientes com alterações retinianas. Entretanto, sabe-se que no

ERG de campo total um aumento da luminância do estímulo que é capaz de ativar o sistema de cones (com o sistema previamente adaptado ao escuro) provoca o aparecimento de um componente inicial negativo, a onda-a (Armington, Johnson, & Riggs, 1952; Hood & Birch, 1990). Isso poderia indicar que a atividade dos cones que contribuem para a resposta mesópica seria responsável pela onda-a no ERG mesópico ON. No caso da onda-b, esta, provavelmente, representa a atividade das células bipolares ON, assim como ocorre com a onda-b do ERG escotópico (Stockton et al., 1989; Sieving, 1993; Hood & Birch, 1996; Robson & Frishman, 2009).

O ERG mesópico OFF encontra-se alterado em jovens com DMD. Considerando o papel da distrofina na comunicação sináptica entre fotorreceptores e células bipolares ON, este resultado poderia ser explicado por um prejuízo na via principal dos bastonetes. Os sinais desta via são enviados às células ganglionares através das células bipolares ON dos bastonetes que se comunicam com as células bipolares ON e OFF dos cones através das células amácrinas (Dolan & Schiller, 1989). O outro circuito indireto dos bastonetes (via junções elétricas com os cones) e o circuito direto dos bastonetes (que promove contato sináptico com as células bipolares OFF dos cones) poderiam estar preservados, considerando a mesma hipótese. A origem do ERG mesópico OFF ainda não é conhecida, mas sabe-se que não é um mecanismo unitário, provavelmente devido aos diferentes circuitos indiretos e direto que os bastonetes utilizam. Aparentemente, a resposta OFF dos bastonetes consiste da mistura de mecanismos que ocorrem mais rapidamente e outros que ocorrem mais lentamente (Naarendorp & Williams, 1999).

Protocolos de estimulação com modulação da luminância em dente de serra foram utilizados por Kremers et al. (1993) para estudar as respostas de células ganglionares para diferentes tipos de apresentação do estímulo luminoso em retina de primatas. Nos últimos dez anos, o protocolo do ERG de campo total com estimulação em dente de serra passou a ser utilizado em humanos para avaliar prejuízos assimétricos em mecanismos ON e OFF da retina de pacientes com retinose pigmentar (Alexander, Barnes, & Frishman, 2001a; Alexander, Fishman, Barnes, & Grover, 2001b; Alexander, Barnes, & Fishman, 2003), retinopatia associada ao melanoma (Alexander, Barnes, Fishman, & Milam, 2002) e CSNB (Barnes, Alexander, & Fishman, 2002; Dryja et al., 2005). Os resultados destes estudos mostraram que o protocolo do ERG com estimulação em dente de serra pode ser utilizado em substituição ao protocolo do ERG com flash de longa duração para a avaliação dos mecanismos ON e OFF mediados pelos cones.

Além da possibilidade de avaliar respostas iniciadas pelos bastonetes, como discutido anteriormente, há algumas vantagens da estimulação em dente de serra sobre o flash de longa duração: i) as respostas ao flash de longa duração apresentam grande variabilidade interindividual (Viswanathan et al., 1999) que parece ser menor no protocolo com dente de serra; ii) no flash de longa duração o sinal é mais contaminado por movimentos oculares e/ou palpebrais; iii) com o protocolo em dente de serra, é possível variar frequência temporal e luminância do estímulo; iv) as respostas de um mesmo sujeito no protocolo em dente de serra é semelhante entre os diferentes ciclos (Alexander et al., 2001b; presente estudo), ou seja, há pouca variabilidade intraindividual.

5.2 Avaliação Psicofísica

Os resultados do presente estudo confirmam os dados da literatura que mostraram que jovens com DMD apresentam acuidade visual normal (Pillers et al., 1993; 1999; Fitzgerald et al., 1994; 1999; Sigesmund et al., 1994; Debecker et al., 1994; Jensen et al., 1995; Pascual-Pascual et al., 1998; Costa et al., 2007b; 2011), mas chama atenção para o fato de que a alteração da acuidade visual pode ocorrer em alguns jovens com DMD devido ao aparecimento da catarata secundária ao uso prolongado de corticóides (Biggar, Gingras, Feblings, Harris, & Steele, 2001). No nosso grupo de pacientes 15% dos jovens avaliados (quatro de 26 sujeitos) apresentaram catarata em ambos os olhos e precisaram ser excluídos do estudo.

Os resultados obtidos confirmam a redução da sensibilidade ao contraste de jovens com DMD e mostram, pela primeira vez para o nosso conhecimento, que essa alteração da sensibilidade ao contraste é assimétrica quando são utilizados estímulos visuais que favorecem a atividade de diferentes vias. Isso significa que apesar da DMD não estar diretamente relacionada à alteração na acuidade visual, as alterações fisiológicas da retina encontradas em jovens com DMD (presente estudo) e estudadas há quase duas décadas (Cibis et al., 1993; Pillers et al., 1993) causam prejuízos à visão que são subclínicos, ou seja, não são encontrados durante a avaliação clínica oftalmológica de rotina.

Recentemente, prejuízos visuais foram mostrados em estudos de avaliação psicofísica de diferentes funções visuais em jovens com DMD (Costa, 2004; Costa et al., 2007b; Costa et al., 2011). Os trabalhos mostraram que

jovens com DMD apresentam prejuízos na discriminação cromática para o eixo verde-vermelho que estão associados à alteração genética *downstream* 30. Os prejuízos na visão de cores estariam relacionados aos prejuízos no desempenho para os testes de memória visual (Zachi et al., 2010). Por outro lado, os autores não encontraram correlação entre o prejuízo na visão de cores e a condição motora em um estudo que avaliou 66 jovens com DMD (Costa et al., 2006). Em resumo, os estudos anteriores mostram que a severidade do prejuízo na visão não está relacionada à condição motora. Entretanto, o tipo de alteração genética e a situação cognitiva do paciente parecem influenciar no resultado do exame de visão de cores. No presente estudo não foram encontradas associações entre o QI e o desempenho nos testes psicofísicos. Talvez a correlação entre os resultados dos testes neuropsicológicos e de sensibilidade ao contraste pudessem indicar alguma associação (análise não realizada no presente trabalho).

O sistema visual humano possui dois mecanismos principais para identificar mudanças na luminância do ambiente, um mecanismo é ativado quando há aumento da luminância média (ON) e o outro quando há diminuição da luminância média (OFF) do ambiente (Schiller, Sandell, & Maunsell, 1986). O teste do xadrez, como é chamado por nosso grupo, vem sendo aplicado para medir a sensibilidade ao contraste positivo (ON) e negativo (OFF) com padrões espaciais e temporais específicos para ativarem, preferencialmente, as vias visuais magnocelular e parvocelular (Costa, 2011). Portadores assintomáticos da Neuropatia Óptica Hereditária de Leber (LHON, em inglês) apresentam prejuízos não seletivos para ambas as vias magnocelular e parvocelular nos mecanismos ON e OFF (Costa et al., 2007a). Os resultados do teste do xadrez

em portadores da LHON estavam de acordo com estudos anteriores que mostraram prejuízos na sensibilidade ao contraste de luminância e cromático (Ventura et al., 2005) e na visão de cores (Ventura et al., 2007), ou seja, prejuízos não seletivos. Em resumo, os estudos com portadores da LHON mostraram que o teste do xadrez identifica uma redução geral da sensibilidade em uma condição na qual os prejuízos visuais são, de fato, não seletivos para uma determinada via visual (Gualtieri et al., 2008).

Os resultados dos voluntários saudáveis obtidos no presente estudo concordam com um estudo anterior que mostrou assimetria para a sensibilidade ao contraste positivo (ON) e negativo (OFF) em sujeitos saudáveis (Moreira, 2010, Costa, 2011). A sensibilidade ao contraste é mais alta quando há diminuição da luminância (OFF) do que quando há aumento da luminância (ON) média em ambos os protocolos (magno e parvo). Os resultados concordam com a literatura que mostra que o sistema visual humano é mais sensível para a diminuição da luminância média do ambiente (Bowen, Pokorny, & Smith, 1989).

Os resultados da avaliação de jovens com DMD mostraram redução na sensibilidade quando há aumento da luminância média (contraste positivo) em relação aos controles, enquanto para a diminuição da luminância média (contraste negativo) jovens com DMD e controles apresentaram sensibilidade média semelhante. Embora os prejuízos sejam mais evidentes para o protocolo ON, parece não haver seletividade para uma determinada via visual. A redução da sensibilidade em jovens com DMD foi encontrada tanto para o protocolo magno, com frequência espacial mais baixa (0,3 cpg) e tempo de apresentação do estímulo mais rápido (33 ms), como para o protocolo parvo, com frequência

espacial mais alta (2 cpg) e tempo de apresentação do estímulo mais lento (1500 ms).

Os resultados de redução para a sensibilidade ao contraste positivo (ON) estão de acordo com o estudo de Benoff et al. (2001) que mostraram prejuízos seletivos para o mecanismo visual ON em jovens com DMD através de registros dos potenciais corticais visuais provocados. Os autores avaliaram jovens com DMD *downstream* 30 e atribuíram o prejuízo em V1 à disfunção das células bipolares ON retinianas. Entretanto, os nossos resultados não confirmam a seletividade para a via visual magnocelular apresentada pelos autores. Prejuízos seletivos para a via magnocelular em jovens com DMD não causariam perdas na discriminação visual para o eixo verde-vermelho na visão de cores (Costa et al., 2007b), por exemplo, e nem para a sensibilidade ao contraste cromático com grades isoluminantes (Costa et al., 2011).

O presente resultado psicofísico sugere que as vias visuais magnocelular e parvocelular são afetadas pela DMD e que os prejuízos devem estar, de fato, relacionados às alterações na comunicação sináptica entre fotorreceptores e células bipolares ON que participam de ambas as vias visuais. Este resultado confirma resultado anterior obtido em avaliação psicofísica em que foi possível o exame das vias parvocelular e koniocelular na visão de cores, tendo havido demonstração de envolvimento seletivo da via parvocelular (Costa et al., 2007b), além do envolvimento de ambas as vias parvocelular e magnocelular na sensibilidade ao contraste espacial de luminância (Costa et al., 2011) Outra avaliação que poderia ser feita seria a do protocolo do ERG com estimulação em flicker heterocromático que permite a separação da atividade das vias magnocelular e parvocelular através da

apresentação em baixa frequência temporal (parvo) ou alta frequência temporal (magno) (Kremers, Rodrigues, Silveira, & da Silva Filho, 2010; Barboni, Ventura, & Kremers, 2010; Barboni, Pangeni, Ventura, Horn, & Kremers, 2011) nos jovens com DMD.

A redução da sensibilidade ao contraste espacial e temporal de luminância em jovens com DMD anteriormente encontrada (Costa et al., 2011) foi confirmada apenas parcialmente no presente estudo, uma vez que foi estatisticamente significativa somente para as frequências espaciais (6,2 e 12,5 cpg) e para a frequência temporal mais alta (20 Hz). A diferença entre os resultados pode estar relacionada ao número de sujeitos avaliados. No estudo anterior, grupos de 57 e 32 jovens com DMD foram avaliados pelos testes de sensibilidade ao contraste espacial e temporal, respectivamente. Além disso, o método psicofísico utilizado foi diferente. No estudo anterior, o método do ajuste foi empregado para estimar os limiares de contraste, enquanto no presente estudo o estímulo visual foi apresentado em todas as tentativas e o observador precisava responder sim ou não a cada tentativa. Talvez este último seja um método de melhor compreensão para os jovens com DMD que muitas vezes apresentam prejuízos cognitivos (Zachi, 2009; Roque et al., 2011).

O contraste espacial de luminância é definido pela diferença do nível de luz entre áreas adjacentes e a sua percepção depende da integridade de estruturas retinianas, assim como das estruturas visuais cerebrais (Westheimer & Campbell, 1962). Redução na sensibilidade ao contraste espacial pode estar presente em diferentes condições que alteram alguma região do sistema visual (Arden, 1978). Por exemplo, alterações retinianas, como ocorre na diabetes

mellitus (Gualtieri, 2004; Gualtieri et al., 2011), ou do nervo óptico, como ocorre na esclerose múltipla (Moura, 2010), ou ainda em condições que afetam tanto a retina quanto áreas visuais cerebrais, como a intoxicação por vapor de mercúrio (Canto-Pereira et al., 2005; Lago, 2005; Ventura et al., 2005) ou por solventes orgânicos (Costa, 2010). No caso da DMD, os prejuízos na sensibilidade ao contraste espacial de luminância provavelmente possuem origem retiniana, considerando as alterações do ERG de campo total encontradas nessa população.

Costa (2004) mostrou que as características espaciais são mais afetadas pela DMD do que as características temporais da visão. Dessa maneira, a redução na sensibilidade ao contraste temporal só foi encontrada em sujeitos com prejuízos na visão de cores. No presente estudo a sensibilidade ao contraste temporal foi semelhante entre controles e jovens com DMD, com exceção da frequência temporal mais alta utilizada (20 Hz) na qual a sensibilidade de jovens com DMD apresentou-se estatisticamente reduzida em relação aos controles.

Os prejuízos na visão de jovens com DMD ocorrem, pelo menos em parte, devido às alterações retinianas discutidas anteriormente, considerando que, assim como ocorre na resposta do ERG de campo total escotópico, os prejuízos da sensibilidade ao contraste em jovens com DMD parecem ser mais severos nos jovens *downstream* 30 (Costa et al., 2011). Entretanto, a presença da distrofina no sistema nervoso central não restringe a origem dos prejuízos à retina. Seria importante a elucidação da participação relativa dos mecanismos centrais e periféricos nas perdas constatadas.

5.3 Relação dos resultados com a localização da distrofina na retina

A presença de diferentes isoformas da distrofina na retina sugere uma regulação complexa de sua expressão no sistema nervoso central (Rodius et al., 1997). O complexo de proteínas associadas à distrofina, que apresenta uma função pós-sináptica nas junções neuro-musculares e no cérebro, localiza-se na camada plexiforme externa da retina provavelmente no lado pré-sináptico nas regiões invaginadas dos terminais dos fotorreceptores. Alguns trabalhos mostraram a associação dos distroglicanos, que pertencem ao complexo, a subunidades de canais de Ca^{2+} da membrana pré-sináptica de fotorreceptores na retina de ratos (Ueda et al., 1995a e b) e pintos (Blank et al., 1997), indicando contribuição do complexo de proteínas associadas à distrofina na regulação da concentração de Ca^{2+} (Ueda et al., 1995a e b) e possível envolvimento na estabilidade mecânica do terminal sináptico de cones e bastonetes (Blank et al., 1997). Além disso, a isoforma menor da distrofina (Dp71) está localizada nas células gliais da retina: i) no terminal dos astrócitos em contato com o epitélio dos vasos sanguíneos, e ii) entre as células de Müller e a membrana limitante interna da retina (Figura 49, Blake & Kröger, 2000). A presença da Dp71 nesses locais sugere sua função na adesão da retina com o vítreo e no equilíbrio homeostático da retina realizado pela células de Müller (Schmitz & Drenckhahn, 1997a; Claudepierre et al., 2000b; Connors & Kofuji, 2002). Entretanto, a proteína utrofina parece compensar parcialmente a função da Dp71 na membrana limitante interna da retina (Puwarawuttipanit et al., 2006; Fort et al., 2008).

Figura 49. Análise imunohistoquímica detecta a distrofina em 3 locais na retina de camundongos: (a) camada plexiforme externa, endotélio de vasos sanguíneos (asteriscos) e bordas entre retina e a membrana limitante interna (setas brancas) refletindo uma alta concentração no terminal das células de Müller; em (b) ampliação para melhor demonstração da marcação observada na camada plexiforme externa, correspondendo aos terminais sinápticos de cones e bastonetes; esquema didático da retina (meio) e desenho da localização da distrofina (linha azul) nas três estruturas da retina: região invaginada do terminal sináptico do fotorreceptor, astrócito e células gliais de Müller (à direita). Modificada de Blake & Kröger (2000).

Legenda: ONL – *outer nuclear layer*; OPL – *outer plexiform layer*; INL – *inner nuclear layer*; IPL – *inner plexiform layer*; GCL – *ganglion cell layer*.

Possíveis prejuízos visuais causados pela ausência da Dp71 retiniana e a hipótese do mecanismo compensatório, apresentada por estudos em modelos animais, poderia ser investigada em humanos com a avaliação de um subgrupo de jovens com DMD com alteração genética *downstream* 63, ou seja, com disfunção na expressão da Dp71 (avaliação não realizada no presente estudo). Esse tipo de alteração genética é mais raro, considerando que a maioria dos jovens com DMD apresenta alteração em regiões centrais do gene (Passos-Bueno et al., 1992; Zatz, 2002). O estudo do ERG em jovens com DMD mas com a isoforma Dp71 preservada (alterações *upstream* exon 63) mostrou alteração severa do ERG de campo total (presente estudo), indicando que a Dp71 não estaria relacionada às alterações do ERG na DMD.

A Dp427 (Ueda et al., 1995; Blank et al., 1999), assim como as isoformas Dp260 e Dp140 (Ueda et al., 1997a e b), foram localizadas na camada plexiforme externa da retina de roedores. Entretanto, padrões de expressão semelhantes para a Dp260 e para os receptores mGluR6 durante o período de maturação funcional no desenvolvimento retiniano sugerem que a Dp260 está fortemente envolvida no estabelecimento de conexões sinápticas na camada plexiforme externa da retina (Rodius et al., 1997). Na retina humana, a distrofina completa e duas isoformas menores, provavelmente a Dp260 e a Dp140, foram localizadas na camada plexiforme externa da retina (Pillars et al., 1993).

Um estudo mostrou, recentemente, que a distrofina também está localizada na camada plexiforme interna da retina de camundongos (Wersinger et al., 2011). O estudo confirmou que a Dp260 é, de fato, a isoforma em maior quantidade na camada plexiforme externa da retina, seguida pela Dp140 e pela Dp427. Em conjunto essas três isoformas localizam-se em maior quantidade nas sinapses dos bastonetes que nas dos cones, entretanto a Dp427 analisada separadamente é mais expressa pelos cones do que pelos bastonetes. Além disso, os autores mostraram pela primeira vez que a Dp427 é expressa por células amácrinas e/ou por células bipolares OFF na camada plexiforme interna da retina. Essa nova evidência sugere uma possível função da Dp427 na comunicação entre as células amácrinas ou as células bipolares OFF com as células ganglionares.

No presente estudo, a alteração da onda-b do ERG escotópico foi encontrada em todos os jovens com DMD, independentemente do tipo de alteração genética, mas foi mais severa nos jovens *downstream* 30. De 6

jovens avaliados, 4 apresentaram onda-b reduzida e em 2 a onda-b estava ausente. De fato, jovens com DMD, assim como os modelos animais da DMD que possuem mutações em regiões mais distais do gene, apresentam as alterações mais severas no ERG (DeBecker et al., 1994; Pillers et al., 1999a e b; Fitzgerald et al., 1999), sugerindo função da Dp260 na neurotransmissão da camada plexiforme externa da retina.

Além do papel essencial da Dp260 para a geração da onda-b do ERG escotópico estabelecido há anos na literatura (Cibis et al., 1993) e confirmado pelo presente estudo, os nossos resultados mostram que a Dp427, localizada nos terminais dos fotorreceptores (Wersinger et al., 2011), deve possuir contribuição na geração da onda-b do ERG escotópico, considerando que os jovens com DMD *upstream* 30 também apresentaram redução da onda-b. No presente estudo, apenas dois jovens com DMD apresentavam esse tipo de alteração genética, portanto o estudo do ERG de campo total em um grupo maior de jovens com DMD *upstream* 30 é necessário para confirmar essa hipótese (Projeto Auxílio à Pesquisa – Regular: recentemente aprovado pela FAPESP).

A sugestão de função da Dp427 na comunicação entre fotorreceptores e células bipolares (que é expressa em maior quantidade pelos cones) estaria de acordo com os nossos achados de alteração do ERG fotópico em jovens com DMD *downstream* e *upstream* 30. Nossos resultados concordam com estudos preliminares (Girlanda et al., 1997; Pascual-Pascual et al., 1998) que mostraram que jovens com DMD apresentam alterações no ERG de campo total independentemente do tipo de alteração genética que possuem. Outros autores mostraram que as alterações genéticas relacionadas à expressão da

isoforma Dp260 provocam as alterações mais severas no ERG escotópico (Cibis et al., 1993; Sigesmund et al., 1994; Jensen et al., 1995; Ino-ue et al., 1997; Pillers et al., 1999a), assim como mostrado no presente estudo.

Com relação à isoforma Dp140, os estudos mostram que no cérebro a sua alteração está relacionada a prejuízos no desenvolvimento cognitivo (Lidov et al., 1990; Lidov & Kunkel, 1997), mas na retina o papel específico da Dp140 não é conhecido. Sabe-se que esta isoforma está presente na retina de roedores (Ueda et al., 1997a e b; Dalloz et al., 2003; Bordais et al., 2004), mais precisamente junto à Dp260 na camada plexiforme externa (Wersinger et al., 2011). No presente estudo, a alteração genética dos jovens com DMD está relacionada à alteração da expressão da isoforma Dp140, cujo promotor localiza-se no exon 45. Somente os dois jovens com DMD *upstream* 30 e apenas um jovem com DMD *downstream* 30 (DMD com deleção do exon 43), possuem a expressão normal da Dp140. Portanto, os resultados do presente estudo não são suficientes para discutir o papel da Dp140 no ERG de jovens com DMD. Para isso, seria necessário estudar o ERG de campo total em um subgrupo de jovens com DMD cuja alteração genética seja *downstream* 30 e *upstream* 45, ou seja, jovens com alteração na expressão da Dp260 que possuem a expressão da Dp140 preservada, e comparar os resultados com os obtidos no presente estudo.

Além da avaliação de jovens com DMD com diferentes tipos de alterações genéticas, uma possível alternativa para se conhecer o papel específico de cada isoforma da distrofina na fisiologia da retina seria o estudo do ERG em diferentes modelos animais do camundongo mdx que possuem mutações de ponto em diferentes posições do gene da DMD e, portanto,

possuem a expressão alterada de isoformas específicas da distrofina (Im et al., 1996).

O ERG com modulação da luminância em dente de serra mostrou respostas alteradas para ambos os protocolos ON e OFF quando há atividade dos bastonetes (condição mesópica) e maior atenuação do pico positivo para o protocolo ON em relação ao protocolo OFF quando há atividade exclusiva da via dos cones (condição fotópica). Os resultados sugerem que a distrofina está localizada provavelmente em regiões sinápticas nas quais ambas as vias visuais ON e OFF recebem sinais dos bastonetes e a via ON recebe os sinais dos cones. Portanto, concorda com a literatura que mostra a distrofina nas regiões invaginadas das sinapses entre os fotorreceptores e as células bipolares ON (Schmitz & Drenckhahn, 1997a e b). Embora exista evidência de contatos sinápticos de células bipolares ON em regiões basais, ou seja, fora da invaginação do terminal sináptico dos cones (Calkins et al., 1996), somente células bipolares difusas promovem esse tipo de contato duplo e apenas em regiões foveais. Como o ERG de campo total avalia a resposta da retina como um todo, é provável que não seja sensível para registrar esse efeito específico.

Os resultados da avaliação psicofísica mostraram redução significativa da sensibilidade ao contraste espacial de luminância em jovens com DMD para os protocolos que estimulam, preferencialmente, o mecanismo ON da via visual. Não foi possível concluir se esta alteração estaria exclusivamente relacionada à ausência da Dp260. Essa relação precisaria ser melhor investigada pelo estudo de um grupo maior de jovens com DMD *upstream* 30.

5.4 Considerações finais

Algumas doenças da retina, como doenças vasculares, toxicidade retiniana, melanoma, miopia degenerativa e CSNB, estão associadas à redução da onda-b do ERG, mas geralmente esses pacientes apresentam prejuízos na acuidade visual associados à alteração fisiológica (Heckenlively, Weleber, & Arden, 1991). Por não apresentar redução na acuidade visual, a DMD pode ser considerada um modelo como poucos para o estudo da eletrofisiologia da retina e dos mecanismos subjacentes a diferentes funções visuais.

O nosso conhecimento sobre as funções da distrofina na retina está longe de estar totalmente elucidado, entretanto o estudo detalhado das relações entre a alteração genética e as mudanças no ERG, faria da retina uma estrutura ideal para o estudo das funções da distrofina e suas isoformas.

A avaliação psicofísica de funções visuais em jovens com DMD também poderia trazer valiosas informações sobre o papel da distrofina e suas isoformas no sistema visual humano. Entretanto, um estudo mais aprofundado deveria incluir pacientes com exame oftalmológico normal (como os pacientes incluídos no presente estudo) e com diferentes tipos de alterações no gene da DMD. Além disso, pacientes com e sem comprometimento cognitivo deveriam ser avaliados para permitir o estudo das relações entre perdas visuais e a condição cognitiva desses jovens. Se possível, deveria ser feita uma avaliação longitudinal para investigar se os prejuízos visuais são progressivos, como as alterações musculares, ou estáveis, como as alterações cognitivas.

6. Conclusões

O presente estudo mostrou que as alterações eletrofisiológicas da retina, assim como as alterações de funções visuais, de jovens com DMD podem ser mais detalhadamente investigadas através de protocolos que buscam estimular, preferencialmente, a atividade de mecanismos visuais específicos.

1. Os resultados do ERG de campo total em jovens com DMD mostram redução na amplitude da onda-b, quando há atividade de bastonetes e atividade exclusiva dos cones, e alteração da onda-b do ERG mesópico OFF quando há atividade de bastonetes. As alterações eletrofisiológicas da retina estão principalmente relacionadas com a atividade do mecanismo visual ON.
2. A alteração na função visual de jovens com DMD está relacionada, ao menos em parte, com os prejuízos retinianos, considerando a redução da sensibilidade ao contraste positivo (ON) encontrada nessa população.

REFERÊNCIAS¹

- Ahn, A. H., & Kunkel, L. M. (1993). The structural and functional diversity of dystrophin. *Nature genetics*, 3, 283-291.
- Alexander, K. R., Barnes, C. S., & Fishman, G. A. (2001a). High-frequency attenuation of the cone ERG and ON-response deficits in X-linked retinoschisis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 42, 2094-2101.
- Alexander, K. R., Barnes, C. S., & Fishman, G. A. (2003). ON-pathway dysfunction and timing properties of the flicker ERG in carriers of X-linked retinitis pigmentosa. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44, 4017-4025.
- Alexander, K. R., Barnes, C. S., Fishman, G. A., & Milam, A. H. (2002). Nature of the cone ON-pathway dysfunction in melanoma-associated retinopathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 43, 1189-1197.
- Alexander, K. R., Fishman, G. A., Barnes, C. S., & Grover, S. (2001b). ON-response deficit in the electroretinogram of the cone system in X-linked retinoschisis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 42, 453-459.
- Alitalo, T., Kruse, T. A., Forsius, H., Eriksson, A. W., & Delachapelle, A. (1991). Localization of the Aland Island Eye Disease locus to the pericentromeric region of the X-chromosome by linkage analysis. *American Journal of Human Genetics*, 48, 31-38.
- Anderson, J. L., Head, S. I., Rae, C., & Morley, J. W. (2002). Brain function in Duchenne muscular dystrophy. *Brain*, 125, 4-13.
- Arden, G. B. (1978). Importance of measuring contrast sensitivity in cases of visual disturbance. *British Journal of Ophthalmology*, 62, 198-209.
- Armington, J. C. (1974). *The Electroretinogram*. New York: Academic Press.
- Armington, J. C., Johnson, E. P., & Riggs, L. A. (1952). The scotopic a-wave in the electrical response of the human retina. *Journal of Physiology*, 118, 289-298.
- Arsanto, J., Caubit, X., Rivier, F., Hugon, G., Thouveny, Y., & Mornet, D. (1999). Expression patterns of dystrophin products, especially of apodystrophin-1/Dp71, in the neural retina of amphibian urodele pleurodeles waltl. *International Journal of Developmental Biology*, 43, 75-83.

¹ De acordo com o estilo APA – American Psychological Association

- Austin, R. C., Howard, P. L., D'Souza, V. N., Klamut, H. J., & Ray, P. N. (1995). Cloning and characterization of alternatively spliced isoforms of Dp71. *Human Molecular Genetics*, 4, 1475-1483.
- Bar, S., Barnea, E., Levy, Z., Neuman, S., Yaffe, D., & Nudel, U. (1990). A novel product of the Duchenne muscular dystrophy gene which greatly differs from the known isoforms in its structure and tissue distribution. *Biochemical Journal*, 272, 557-560.
- Barboni, M. T. S., Pangeni, G., Ventura, D. F., Horn, F., Kremers, J. (2011). Heterochromatic flicker electroretinograms reflecting luminance and cone opponent activity in glaucoma patients. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52, 6757-6765.
- Barboni, M. T. S., Ventura, D. F., & Kremers, J. (2010). Absence of ocular interaction in flicker ERG responses reflecting cone opponent and luminance signals. *Documenta Ophthalmologica*, 121, 69-75.
- Barbujani, G., Russo, A., Danieli, G. A., Spiegler, A. W., Borkowska, J., & Petruszewicz, I. H. (1990). Segregation analysis of 1885 DMD families: significant departure from the expected proportion of sporadic cases. *Human Genetics*, 84, 522-526.
- Bardoni, A., Felisari, G., Sironi, M., Comi, G., Lai, M., Robotti, M., & Bresolin, N. (2000). Loss of Dp140 regulatory sequences is associated with cognitive impairment in dystrophinopathies. *Neuromuscular Disorders*, 10, 194-199.
- Barlow, H. B., Levick, W. R., & Yoon, M. (1971). Responses to single quanta of light in retinal ganglion cells of the cat. *Vision Research*, suppl 3, 87-101.
- Barnes, C. S., Alexander, K. R., Fishman, G. A. (2002). A distinctive form of congenital stationary night blindness with cone ON-pathway dysfunction. *Ophthalmology*, 109, 575-583.
- Baylor, D. A. (1987). Photoreceptor signals and vision. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 28, 34-49.
- Baylor, D. A., Lamb, T. D., & Yau, K. W. (1979). Responses of retinal rods to single photons. *Journal of Physiology*, 288, 613-634.
- Benoff, K., Fitzgerald, K., Zemon, V., Pinkhasov, E., Gordon, J., & Cibis, G. (2001). Magnocellular ON-pathway deficits in Duchenne muscular dystrophy: A visual evoked potential study. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 42, S787.
- Berson, E. L., Gouras, P., & Gunkel, R. D. (1968). Rod responses in retinitis pigmentosa, dominantly inherited. *Archives of Ophthalmology*, 80, 58-67.

- Berson, E. L., Gouras, P., Gunkel, R. D., & Myrianthopoulos, N. C. (1969). Rod and cone responses in sex-linked retinitis pigmentosa. *Archives of Ophthalmology*, 81, 215–225.
- Bettecken, T., Aissani, B., Müller, C. R., & Bernardi, G. (1992). Compositional mapping of the human dystrophin-ecoding gene. *Gene*, 122, 329-335.
- Biggar, W. D., Gingras, M., Feblings, D. L., Harris, V. A., & Steele, C. A. (2001). Deflazacort treatment of Duchenne muscular dystrophy. *The Journal of Pediatrics*, 138, 45-50.
- Billard, C., Gillet, P., Barthez, M., Hommet, C., & Bertrand, P. (1998). Reading ability and processing in Duchenne muscular dystrophy and spinal muscular atrophy. *Developmental Medicine and Child Neurology*, 40, 12-20.
- Blake, D. J., & Kroger, S. (2000). The neurobiology of Duchenne muscular dystrophy: learning lessons from muscle. *Trends in NeuroSciences*, 23, 92-99.
- Blake, D. J., Weir, A., Newey, S. E., & Davies, K. E. (2002). Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiological Reviews*, 82, 291-329.
- Blank, M., Blake, D. J., & Kroger, S. (2002). Molecular diversity of the dystrophin-like protein complex in the developing and adult avian retina. *Neuroscience*, 111, 259-273.
- Blank, M., Koulen, P., Blake, D. J., & Kroger, S. (1999). Dystrophin and beta-dystroglycan in photoreceptor terminals from normal and mdx(3Cv) mouse retinæ. *European Journal of Neuroscience*, 11, 2121-2133.
- Blank, M., Koulen, P., & Kroger, S. (1997). Subcellular concentration of beta-dystroglycan in photoreceptors and glial cells of the chick retina. *Journal of Comparative Neurology*, 389, 668-678.
- Blasdel, G. G., & Lund, J. S. (1983). Termination of afferent axons im macaque striate cortex. *The Journal of Neuroscience*, 3, 1389-1413.
- Bordais, A., Varela, C., Fort, P., Sahel, J., & Rendon, A. (2004). Pre- and post-synaptic localization at the outer plexiform layer of dystrophins Dp427, Dp260 and Dp140: functional implications. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 45, E-Abstract 5358.
- Bordais, A., Bolanos-Jimenez, F., Fort, P., Varela, C., Sahel, J., Picaud, S., & Rendon, A. (2005). Molecular cloning and protein expression of Duchenne muscular dystrophy gene products in porcine retina. *Neuromuscular Disorders*, 15, 476–487.

- Bowen, R. W., Pokorny, J., & Smith, V. C. (1989). Sawtooth contrast sensitivity decrements have the edge. *Vision Research*, 29, 1501-1509.
- Bowmaker, J. K., & Dartnall, H. J. A. (1980). Visual pigments of rods and cones in a human retina. *Journal of Physiology*, 298, 501-511.
- Boycott, B. B., & Wässle, H. (1991) Morphological classification of bipolar cells in the macaque retina. *European Journal of Neuroscience*, 3, 1069–1088.
- Bresolin, N., Castelli, E., Comi, G. P., Felisari, G., Bardoni, A., Perani, D., Grassi, F., Turconi, A., Mazzucchelli, F., Gallotti, D. et al. (1994). Cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders*, 4, 359-369.
- Brown, P. K., & Wald, G. (1964). Visual pigments in single rods and cones of human retina – direct measurements reveals mechanisms of human night and color vision. *Science*, 144, 45-47.
- Brown, R. H. (1997). Dystrophin-associated proteins and the muscular dystrophies. *Annual Review of Medicine*, 48, 457-466.
- Buck, S. L. (2003). Rod-cone interactions in human vision. In: L. M. Chalupa & J. S. Werner (Eds.). *The visual neurosciences* (pp. 863-878). Cambridge, MA: MIT Press.
- Burns, M. E., & Lamb, T. D. (2003). Visual transduction by rod and cone photoreceptors. In: L. M. Chalupa & J. S. Werner (Eds.). *The visual neurosciences* (pp. 215-233). Cambridge, MA: MIT Press.
- Bush, R. A., & Sieving, P. A. (1994). A proximal retinal component in the primate photopic ERG a-wave. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 35, 635-645.
- Bushby, K. M. D. (1992). Genetic and clinical correlations of Xp21 muscular-dystrophy. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 15, 551-564.
- Byers, T. J., Lidov, H. G. W., & Kunkel, L. M. (1993). An alternative dystrophin transcript specific to peripheral nerve. *Nature Genetics*, 4, 77-81.
- Calkins, D. J., Tsukamoto, Y., & Sterling, P. (1996). Foveal cones form basal as well as invaginating junctions with diffuse ON bipolar cells. *Vision Research*, 36, 3373-3381.
- Campbell, K. P., & Kahl, S. D. (1991). Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature*, 338, 259-262.
- Campbell, K. P. (1995). Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell*, 80, 675-679.

- Canto-Pereira, L. H., Lago, M., Costa, M. F., Rodrigues, A. R., Saito, C. A., Silveira, L. C. L., & Ventura, D. F. (2005). Visual impairment on dentists related to occupational mercury exposure. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19, 517-522.
- Cao, D., Pokorny, J., & Grassi, M. A. (2011). Isolated mesopic rod and cone electroretinograms realized with a four-primary method. *Documenta Ophthalmologica*, 123, 29-41.
- Chamberlain, J. S. (2010). Duchenne muscular dystrophy models show their age. *Cell*, 143, 1040-1042.
- Chelly, J., Hamard, G., Koulakoff, A., Kaplan, J. C., Kahn, A., & Berwaldnetter, Y. (1990). Dystrophin gene transcribed from different promoters in neuronal and glial-cells. *Nature*, 344, 64-65.
- Chelly, J., Kaplan, J. C., Maire, P., Gautron, S., & Kahn, J. (1988). Transcription of dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissues. *Nature*, 333, 858-860.
- Chen, C., Zuo, C., Piao, C., & Miyake, Y. (2005). Recording rod ON and OFF response in ERG and multifocal ERG. *Documenta Ophthalmologica*, 111, 73-81.
- Chun, M. H., Grunert, U., Martin, P.R., & Wässle, H. (1996). The synaptic complex of cones in the fovea and in the periphery of the macaque monkey retina. *Vision Research*, 36, 3383-3395.
- Cia, D., Simonutti, M., Sene, A., Benard, R., Roux, M., Doly, M., Sahel, J., & Rendon, A. (2010). ERG responses in the dystrophin Dp71-null mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51, 4033.
- Cibis, G. W., & Fitzgerald, K. M. (2001). The negative ERG is not synonymous with nightblindness. *Transactions of the American Ophthalmological Society*, 99, 171-175.
- Cibis, G. W., Fitzgerald, K. M., Harris, D. J., Rothberg, P. G., & Rupani, M. (1993). The effects of dystrophin gene mutations on the ERG in mice and humans. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 34, 3646-3652.
- Claudepierre, T., Dalloz, C., Mornet, D., Matsumura, K., Sahel, J., & Rendon, A. (2000a). Characterization of the intermolecular associations of the dystrophin-associated glycoprotein complex in retinal Muller glial cells. *Journal of Cell Science*, 113, 3409-3417.
- Claudepierre, T., Mornet, D., Pannicke, T., Forster, V., Dalloz, C., Bolanos, F., Sahel, J., Reinchenbach, A. & Rendon, A. (2000b). Expression of Dp71 in Muller glial cells: A comparison with utrophin- and dystrophin-associated proteins. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 41, 294-304.

- Claudepierre, T., Rodius, F., Frasson, M., Fontaine, V., Picaud, S., Dreyfus, H. Monet, D., & Rendon, A. (1999). Differential distribution of dystrophins in rat retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 40, 1520-1529.
- Connors, N. C., & Kofuji, P. (2002). Dystrophin Dp71 is critical for the clustered localization of potassium channels in retinal glial cells. *Journal of Neuroscience*, 22, 4321-4327.
- Costa, M. F. (2004). *Perdas visuais na distrofia muscular de Duchenne: visão de cores e visão de contrastes de luminância espacial e temporal*. Tese de doutorado, Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo.
- Costa, M. F. (2011). Clinical psychophysical assessment of the ON- and OFF-systems of the magnocellular and parvocellular visual pathways. *Neuroscience and Medicine*, 2, 330-340.
- Costa, M. F., Barboni, M. T. S., & Ventura, D. F. (2011). Psychophysical measurements of luminance and chromatic spatial and temporal contrast sensitivity in Duchenne muscular dystrophy. *Psychology & Neuroscience*, 4, 67-74.
- Costa, M. F., Gualtieri, M., Oliveira, A. G. F., Sadun, F., DeNegri, A. M., Berezovsky, A., Salomao, S. R., Carelli, V., Sadun, A. A., & Ventura, D. F. (2007a). Contrast sensitivity mediated by ON- and OFF-subsystems of the magno- and parvocellular pathways of asymptomatic carriers of 11778 LHON. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 48, 941.
- Costa, M. F., Oliveira, A. G. F., Feitosa-Santana, C., Zatz, M., & Ventura, D. F. (2007b). Red-green color vision impairment in Duchenne Muscular Dystrophy. *American Journal of Human Genetics*, 80, 1064-1075.
- Costa, M. F., Oliveira, A. G. F., Feitosa-Santana, C., Lago, M., Zatz, M., & Ventura, D. F. (2005). Red-green color vision and luminance contrast sensitivity losses in Duchenne muscular dystrophy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 46, 4576.
- Costa, M. F., Oliveira, A. G. F., Feitosa-Santana, C., Lago, M., Zatz, M., & Ventura, D. F. (2006). Aspects of color vision in Duchenne muscular dystrophy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 47, 3700.
- Costa, M. F., Ventura, D. F., Pavanello, R. C. M., Cerqueira, A., & Zatz, M. (2004). Color vision phenotype in Duchenne muscle dystrophy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 45, 424.
- Costa, T. L. (2010). *Repercussões visuais da exposição ocupacional a uma mistura de solventes orgânicos: visão cromática e acromática em frentistas brasileiros*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo.

- Cox, G. A., Phelps, S. F., Chapman, V. M., & Chamberlain, J. S. (1993). New mdx mutation disrupts expression of muscle and nonmuscle isoforms of dystrophin. *Nature genetics*, 4, 87-93.
- D'Souza, V. N., Nguyen, T. M., Morris, G. E., Karges, W., Pillers, D. A., & Ray, P. N. (1995). A novel dystrophin isoform is required for normal retinal electrophysiology. *Human Molecular Geneics*, 4, 837-842.
- Dacey, D. M., Liao, H. W., Peterson, B. B., Robinson, F. R., Smith, V. C., Pokorny, J., Yau, K. W., & Gamlin, P. D. (2005). Melanopsin-expressing ganglion cells in primate retina signal colour and irradiance and project to the LGN. *Nature*, 433, 749-754.
- Dacey, D. M., & Parker, O. S. (2003). Colour coding in the primate retina: diverse cell types and cone-specific circuitry. *Current Opinion in Neurobiology*, 13, 421-427.
- Dacheux, R. F., & Raviola, E. (1986). The rod pathway in the rabbit retina: a depolarizing bipolar and amacrina cell. *The Journal of Neuroscience*, 6, 331-345.
- Dalloz, C., Claudepierre, T., Rodius, F., Mornet, D., Sahel, J., & Rendon, A. (2001). Differential distribution of the members of the dystrophin glycoprotein complex in mouse retina: effect of the mdx(3Cv) mutation. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 17, 908-920.
- Dalloz, C., Sarig, R., Fort, P., Yaffe, D., Bordais, A., Pannicke, T., Grosche, J., Monet, D., Reichenbach, A., Sahel, J., Nudel, U., & Rendon, A. (2003). Targeted inactivation of dystrophin gene product Dp71: phenotypic impact in mouse retina. *Human Molecular Genetics*, 12, 1543-1554.
- Dartnall, H. J., Bowmaker, J. K., & Mollon, J. D. (1983). Human visual pigments: microspectrophotometric results from the eyes of seven persons. *Proceedings of the Royal Society of London*, 220, 115-130.
- Davson, H. (1980). Retinal structure and organization. In H. Davson (Ed.), *Physiology of the eye* (4th ed., pp. 167-177). New York: Churchill Livingstone.
- Daw, N. W., Jensen, R. J., & Brunken, W. J. (1990). Rod pathways in mammalian retinae. *Trends in Neuroscience*, 13, 110-115.
- Dawson, W. W., Trick, G. L., & Litzkow, C. A. (1979). Improved electrode for electroretinography. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 18, 988-991.
- Deans, M. R., Völgyi, B., Goodenough, D. A., Bloomfield, S. A., & Paul, D. L. (2002). Connexin36 is essential for transmission of rod-mediated visual signals in the mammalian retina. *Neuron*, 36, 1-20.

- DeBecker, I., Dooley, J. & Tremblay, F. (1993). Pathognomonic negative electroretinogram but not congenital stationary night blindness in Duchenne muscular dystrophy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 34, 1076.
- DeBecker, I., Riddell, D. C., Dooley, J. M., & Tremblay, F. (1994). Correlation between electroretinogram findings and molecular analysis in the Duchenne muscular dystrophy phenotype. *British Journal of Ophthalmology*, 78, 719-722.
- DeVries, S. H. (2000). Bipolar cells use Kainate and AMPA receptors to filter visual information into separate channels. *Neuron*, 28, 847-856.
- Dolan, R. P., & Schiller, P. H. (1989). Evidence for only depolarizing rod bipolar cells in the primate retina. *Visual Neuroscience*, 2, 421-424.
- Drenckhahn, D., Holbach, M., Ness, W., Schmitz, F., & Anderson, L. V. B. (1996). Dystrophin and the dystrophin-associated glycoprotein, beta-dystroglycan, co-localize in photoreceptor synaptic complexes of the human retina. *Neuroscience*, 73, 605-612.
- Dryja, T. P., McGee, T. L., Berson, E. L., Fishman, G. A., Sandberg, M. A., Alexander, K. R., Derlacki, D. J., & Rajagopalan, A. S. (2005). Night blindness and abnormal cone electroretinogram ON responses in patients with mutations in the GRM6 gene encoding mGluR6. *Proceedings of the National Academy of Science*, 102, 4884-4889.
- Dupas, B. M., Benard, R., Tadayoni, R., Sene, A., Roux, M., Sahel, J., & Rendon, A. (2008). Dystrophin Dp71 localization in the retinal vascular system. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 49, 5885.
- Ebrey, T., & Koutalos, Y. (2001). Vertebrate photoreceptors. *Progress in Retinal and Eye Research*, 20, 49-94.
- Emery, A. E. H. (1966). Genetic linkage between the loci for colour blindness and Duchenne type muscular dystrophy. *Journal of Medical Genetics*, 3, 92-95.
- Emery, A. E. H. (1998). The muscular dystrophies. *British Medical Journal*, 317, 991-995.
- Emery, A. E. H. (2001). Muscular dystrophy - an evolving concept. In A. E. H. Emery (Ed.). *The muscular dystrophies* (pp. 1-9). New York: Oxford University Press.
- Emery, A. E. H., & Emery, M. L. H. (1993). Meryon, Edward (1809-1880) and Muscular-Dystrophy. *Journal of Medical Genetics*, 30, 506-511.

- Essex, C., & Roper, H. (2001). Lesson of the week: late diagnosis of Duchenne's muscular dystrophy presenting as global developmental delay. *British Medical Journal*, 323, 37-38.
- Famiglietti, E. V., & Kolb, H. (1975). A bistratified amacrine cell and synaptic circuitry in the inner plexiform layer of the retina. *Brain Research*, 84, 293-300.
- Field, G. D., & Chichilnisky, E. J. (2007). Information processing in the primate retina: circuitry and coding. *Annual Review of Neuroscience*, 30, 1-30.
- Fitzgerald, K. M., Cibis, G. W., Gettel, A. H., Rinaldi, R., Harris, D. J., & White, R. A. (1999). ERG phenotype of a dystrophin mutation in heterozygous female carriers of Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Medical Genetics*, 36, 316-322.
- Fitzgerald, K. M., Cibis, G. W., Giambrone, S. A., & Harris, D. J. (1994). Retinal signal transmission in Duchenne muscular-dystrophy - evidence for dysfunction in the photoreceptor/depolarizing bipolar cell pathway. *The Journal of Clinical Investigation*, 93, 2425-2430.
- Fitzgerald, K. M., Cibis, G. W., Harris, D. J., & Rothberg, P. G. (1993). On-responses and off-responses of the photopic ERG in Duchenne muscular dystrophy and congenital stationary night blindness. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 34, 1076.
- Fort, P., Bordais, A., Estrada-Mena, F. J., Yaffe, D., Nudel, U., Sahel, J., & Rendon, A. (2004). Molecular characterization in isolated Müller glial cells of the functional complexes of Dp71 and/or utrophin with Kir4.1 and AQP4. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 45, 5291.
- Fort, P. E., Sene, A., Pannicke, T., Roux, M. J., Forster, V., Mornet, D., Nudel, U., Yaffe, D., Reichenbach, A., Sahel, J. A., & Rendon, A. (2008). Kir4.1 and AQP4 associate with Dp71- and utrophin-DAPs complexes in specific and defined microdomains of Müller retinal glial cell membrane. *Glia*, 56, 597-610.
- Fortina, P., Cheng, J., Shoffner, M. A., Surrey, S., Hitchcock, W. M., Kricka, L. J., & Wilding, P. (1997). Diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy and quantitative identification of carrier status by use of entangled solution capillary electrophoresis. *Clinical Chemistry*, 43, 745-751.
- Frishman, L. J. (2006). Origins of the electroretinogram. In: J. R. Heckenlively & G. B. Arden (Eds). *Principles and Practice of Clinical Electrophysiology of Vision* (2nd. Ed., pp. 139-183). Cambridge, MA: MIT Press.
- Gilberto, F., Ferreira, V., Dalamon, V., & Szijan, I. (2004). Dystrophin deletions and cognitive impairment in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Neurological Research*, 26, 83-87.

- Girlanda, P., Quartarone, A., Buceti, R., Sinicropi, S., Macaione, V., Saad, F. A., Messina, L., Danieli, G. A., Ferreri, G., & Vita, G. (1997). Extra-muscle involvement in dystrophinopathies: an electroretinography and evoked potential study. *Journal of the Neurological Sciences*, 146, 127-132.
- Green, D. G., Guo, H., & Pillers, D. A. M. (2004). Normal photoresponses and altered b-wave responses to APB in the mdxCv3 mouse isolated retina ERG supports role for dystrophin in synaptic transmission. *Visual Neuroscience*, 21, 739-747.
- Greig, D. N. (1977). Family in which Duchenne's muscular dystrophy and protan colour blindness are segregating. *Journal of Medical Genetics*, 14, 130-132.
- Granit R. (1933). The components of the retinal action potential in mammals and their relation to the discharge in the optic nerve. *Journal of Physiology*, 77, 207-239.
- Gualtieri, M. (2004). *Visão de cores e sensibilidade ao contraste em indivíduos com Diabete Melito: avaliação psicofísica e eletrofisiológica*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo.
- Gualtieri, M., Bandeira, M., Hamer, R. D., Costa, M. F., Oliveira, A. G. O., Moura, A. L., Sadun, F., De Negri, A. M., Berezovsky, A., Salomão, S. R., Carelli, V., Sadun, A. A., & Ventura, D. F. (2008). Psychophysical analysis of contrast processing segregated into magnocellular and parvocellular systems in asymptomatic carriers of 11778 Leber's hereditary optic neuropathy. *Visual Neuroscience*, 25, 469-474.
- Gualtieri, M., Bandeira, M., Hamer, R. D., Damico, F. M., Moura, A. L. A., & Ventura, D. F. (2011). Contrast sensitivity mediated by inferred magno- and parvocellular pathways in type 2 diabetics with and without nonproliferative retinopathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52, 1151-1155.
- Gurevich, L., & Slaughter, M. M. (1993). Comparison of the waveforms of the ON bipolar neuron and the b-wave of the electroretinogram. *Vision Research*, 33, 2431-2435.
- Hack, I., Peichl, L., & Brandstätter, J. H. (1999). An alternative pathway for rod signals in the rodent retina: rod photoreceptors, cone bipolar cells, and the localization of glutamate receptors. *Proceedings of the National Academy of Science*, 96, 14130-14135.
- Hanly, M., & MacKay, D. M. (1979). Polarity-sensitive perceptual adaptation to temporal sawtooth modulation of luminance. *Experimental Brain Research*, 35, 37-46.

- Haenggi, T., & Fritschy, J. M. (2006). Role of dystrophin and utrophin for assembly and function of the dystrophin glycoprotein complex in non-muscle tissue. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63, 1614-1631.
- Hartline, H. K. (1940). The receptive fields of optic nerve fibers, *American Journal of Physiology*, 130, 690-699.
- Hartline, H. K. (1969). Visual receptors and retinal interaction. *Science*, 164, 270-278.
- Hauser, M. A., & Chamberlain, J. S. (1996). Progress towards gene therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Endocrinology*, 149, 373-378.
- Heckenlively, J. R., Weleber, R. G., & Arden, G. B. (1991). Testing levels of the visual system. In: L. M. Chalupa & J. S. Werner (Eds.). *The visual neurosciences* (pp. 485-493). Cambridge, MA: MIT Press.
- Hendry, S.H., & Reid, R.C. (2000). The koniocellular pathway in primate vision. *Annual Reviews of Neuroscience*, 23, 127-153.
- Hoffman, E. P., Brown, R. H., Jr., & Kunkel, L. M. (1987a). Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*, 51, 919-928.
- Hoffman, E. P., Fischbeck, K. H., Brown, R. H., Johnson, M., Medori, R., Loike, J. D., Harris, J. B., Waterston, R., Brooke, M., Specht, L., et al. (1988). Characterization of dystrophin in muscle-biopsy specimens from patients with Duchennes or Beckers muscular-dystrophy. *New England Journal of Medicine*, 318, 1363-1368.
- Hoffman, E. P., Monaco, A. P., Feener, C. C., & Kunkel, L. M. (1987b). Conservation of the Duchenne muscular dystrophy gene in mice and humans. *Science*, 238, 347-350.
- Hood, D. C., & Birch, D. G. (1990). The a-wave of the human electroretinogram and rod receptor function. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 31, 2070-2081.
- Hood, D. C., & Birch, D. G. (1996). b wave of the scotopic (rod) electroretinogram as a measure of the activity of human on-bipolar cells. *Journal of the Optical Society of America A*, 13, 623-633.
- Horn, F. K., Gottschalk, K., Mardin, C. Y., Pageni, G., Jünemann, A. G., & Kremers, J. (2011). ON and OFF responses of the photopic full field ERG in normal subjects and glaucoma patients. *Documenta Ophthalmologica*, 122, 53-62.
- Howard, P. L., Dally, G. Y., Wong, M. H., Ho, A., Weleber, R. G., Pillers, D. M., & Ray, P. N. (1998). Localization of dystrophin isoform Dp71 to the inner

limiting membrane of the retina suggests a unique functional contribution of Dp71 in the retina. *Human Molecular Genetics*, 7, 1385-1391.

Hubel, D. H., & Wiesel, T. N. (1968). Receptive fields and functional architecture of monkey striate cortex. *Journal of Physiology*, 195, 215-243.

Hubel, D. H., & Wiesel, T. N. (1974). Uniformity of monkey striate cortex: a parallel relationship between field size, scatter, and magnification factor. *Journal of Comparative Neurology*, 158, 295-306.

Human Genome Project:

http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/project/info.shtml
em 10 de janeiro de 2011

Im, W. B., Phelps, S. F., Copen, E. H., Adams, E. G., Slightom, J. L., & Chamberlain, J. S. (1996). Differential expression of dystrophin isoforms in strains of mdx mice with different mutations. *Human Molecular Genetics*, 5, 1149-1153.

Ino-ue, M., Honda, S., Nishio, H., Matsuo, M., Nakamura, H., & Yamamoto, M. (1997). Genotype and electroretinal heterogeneity in Duchenne muscular dystrophy. *Experimental Eye Research*, 65, 861-864.

Jastrow, H., Koulen, P., Altrock, W. D., & Kroger, S. (2006). Identification of a β -dystroglycan immunoreactive subcompartment in photoreceptor terminals. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 47, 17-24.

Jay, V., & Vajsar, J. (2001). The dystrophy of Duchenne. *Lancet*, 357, 550-552.

Jensen, H., Warburg, M., Sjo, O., & Schwartz, M. (1995). Duchenne muscular dystrophy: negative electroretinograms and normal dark adaptation. Reappraisal of assignment of X linked incomplete congenital stationary night blindness. *Journal of Medical Genetics*, 32, 348-351.

Joselevitch, C. (2008). Human retinal circuitry and physiology. *Psychology and Neuroscience*, 1, 141-165.

Kameya, S., Araki, E., Katsuki, M., Mizota, A., Adachi, E., Nakahara, K., Nonaka, I., Sakuragi, S., Takeda, S., & Nabeshima, Y. (1997). Dp260 disrupted mice revealed prolonged implicit time of the b-wave in ERG and loss of accumulation of beta-dystroglycan in the outer plexiform layer of the retina. *Human Molecular Genetics*, 6, 2195-2203.

Kaminski, H. J., Alhakim, M., Leigh, R. J., Katirji, M. B., & Ruff, R. L. (1992). Extraocular-Muscles are spared in advanced Duchenne dystrophy. *Annals of Neurology*, 32, 586-588.

Khurana, T. S., Prendergast, R. A., Alameddine, H. S., Tome, F. M. S., Fardeau, M., Arahata, K., Sugita, H., & Kunkel, L. M. (1995). Absence of extraocular-muscle pathology in Duchennes muscular-dystrophy - role for

calcium homeostasis in extraocular-muscle sparing. *Journal of Experimental Medicine*, 182, 467-475.

Koenig, M., Hoffman, E. P., Bertelson, C. J., Monaco, A. P., Feener, C., & Kunkel, L. M. (1987). Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell*, 50, 509-517.

Koenig, M., Monaco, A. P., & Kunkel, L. M. (1988). The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell*, 53, 219-226.

Kolb, H. (2003). How the retina works. *American Scientist*, 91, 28-35.

Kolb, H., & Famiglietti, E. V. (1974). Rod and cone pathways in the inner plexiform layer of the cat retina. *Science*, 186, 47-49.

Koulen, P., Blank, M. & Kröger, S. (1998). Differential distribution of beta-dystroglycan in rabbit and rat retina. *Journal of Neuroscience Research*, 51, 735-747.

Kuffler, S. W. (1953). Discharge patterns and functional organization of mammalian retina. *Journal of Neurophysiology*, 16, 37-68.

Kremers, J., Lee, B. B., Pokorny, J., & Smith, V. C. (1993). Responses of macaque ganglion cells and human observers to compound periodic waveforms. *Vision Research*, 33, 1997-2011.

Kremers, J., Rodrigues, A. R., Silveira, L. C., & da Silva Filho, M. (2010). Flickers ERG representing chromaticity and luminance signals. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51, 577-587.

Lachapelle, P. (2006). The oscillatory potentials of the electroretinogram. In J. R. Heckenlively & G. B. Arden (Eds.). *Principles and Practice of Clinical Electrophysiology of Vision* (2nd ed., pp. 565-580). Cambridge, MA: MIT Press.

Lachapelle, P., Benoit, J., Rousseau, S., McKerral, M., Polomeno, R. C., Little, J. M., & Koeneke, R. (1998). Evidence supportive of a functional discrimination between photopic oscillatory potentials as revealed with a cone and rod mediated retinopathies. *Documenta Ophthalmologica*, 95, 35-54.

Lachapelle, P., Little, J. M., & Polomeno, R. C. (1983). The photopic electroretinogram in congenital stationary night blindness with myopia. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 24, 442-450.

Lago, M. (2005). Sensibilidade ao contraste espacial de luminância e cromático em pacientes intoxicados por vapor de mercúrio: evolução em dois anos. Dissertação de Mestrado, Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo.

- Lidov, H. G. W., Byers, T. J., Watkins, S. C., & Kunkel, L. M. (1990). Localization of dystrophin to postsynaptic regions of central nervous system cortical neurons. *Nature*, 348, 725-727.
- Lidov, H. G. W. & Kunkel, L. M. (1997). Dp140: alternatively spliced isoforms in brain and kidney. *Genomics*, 45, 132-139.
- Luz, M. A. M., Marques, M. J., & Santo Neto, H. (2002). Impaired regeneration of dystrophin-deficient muscle fibers is caused by exhaustion of myogenic cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 35, 691-695.
- Maffei, L., Fiorentini, A., Bisti, S., & Hollander, H. (1985). Pattern ERG in the monkey after section of the optic nerve. *Experimental Brain Research*, 59, 423-425.
- Marmor, M. F., Fulton, A. B., Holder, G. E., Miyake, Y., Brigell, M., & Bach, M. (2009). ISCEV standard for full-field clinical electroretinography (2008 update). *Documenta Ophthalmologica*, 118, 69-77.
- Marmor, M. F., Holder, G. E., Seeliger, M. W., & Yamamoto, S. (2004). Standard for clinical electrophysiology (2004 update). *Documenta Ophthalmologica*, 108, 107-114.
- Marmor, M. F., & Zrenner, E. (1999). Standard for clinical electroretinography (1999 update). *Documenta Ophthalmologica*, 97, 143-156.
- Mehler, M. F. (2000). Brain dystrophin, neurogenetics and mental retardation. *Brain Research Reviews*, 32, 277-307.
- Michalak, M., & Opas, M. (1997). Functions of dystrophin and dystrophin associated proteins. *Current Opinion in Neurology*, 10, 436-442.
- Migdale, K., Herr, S., Klug, K., Ahmad, K., Linberg, K., Sterling, P., & Schein, S. (2003). Two ribbon synaptic units in rod photoreceptors of macaque, human, and cat. *The Journal of Comparative Neurology*, 455, 100-112.
- Miike, T., Miyatake, M., Zhao, J. E., Yoshioka, K., & Uchino, M. (1989). Immunohistochemical dystrophin reaction in synaptic regions. *Brain & Development*, 11, 344-346.
- Miller R. F., & Dowling J. E. (1970). Intracellular responses of Müller (glial) cells of mudpuppy retina: their relation to the b-wave of the electroretinogram. *Journal of Neurophysiology*, 33, 323-341.
- Miyake, Y., Yagasaki, K., Horiguchi, M., Kawase, Y., & Kanda, T. (1986). Congenital night stationary blindness with negative electroretinogram: a new classification. *Archives of Ophthalmology*, 104, 1013-1020.

- Miyatake, M., Miike, T., Zhao, J., Yoshioka, K., Uchino, M., Usuku, G. (1991). Dystrophin: localization and presumed function. *Muscle and Nerve*, 14, 113-119.
- Moizard, M. P., Billard, C., Toutain, A., Berret, F., Marmin, N., & Moraine, C. (1998). Are Dp71 and Dp140 brain dystrophin isoforms related to cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy? *American Journal of Medical Genetics*, 80, 32-41.
- Montanaro, F., Carbonetto, S., Campbell, K. P., & Lindenbaum, M. (1995). Dystroglycan expression in the wild-type and mdx mouse neural retina - synaptic colocalization with dystrophin, dystrophin-related protein but not laminin. *Journal of Neuroscience Research*, 42, 528-538.
- Moreira, S. M. C. F. (2010). *Desenvolvimento da sensibilidade ao contraste de luminância espacial e temporal*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo.
- Morigiwa, K., & Vardi, N. (1999). Differential expression of ionotropic glutamate receptor subunits in the outer retina. *The Journal of Comparative Neurology*, 405, 173-184.
- Morris, G. E., Simmons, C., & Man, N. T. (1995). Apo-dystrophins (Dp140 and Dp71) and dystrophin splicing Isoforms in developing brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 215, 361-367.
- Moser, H. (1984). Duchenne muscular dystrophy - pathogenetic aspects and genetic prevention. *Human Genetics*, 66, 17-40.
- Moukhles, H., Roque, R., & Carbonetto, S. (2000). α -dystroglycan isoforms are differentially distributed in adult rat retina. *The Journal of Comparative Neurology*, 420, 182-194.
- Moura, A. L. A. (2010). *Percepção de contrastes e perdas neurais na esclerose múltipla*. Tese de doutorado, Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo.
- Moura, M. C. D. S., do Valle, L. E. R., Resende, M. B. D., & Pinto, K. O. (2010). Visuospatial attention disturbance in Duchenne muscular dystrophy. *Developmental Medicine and Child Neurology*, 52, 10-15.
- Muntoni, F., Torelli, S., & Ferlini, A. (2003). Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurology*, 2, 731-740.
- Musarella, M. A., Weleber, R. G., Murphey, W. H., Young, R. S. L., Ansoncartwright, L., Mets, M., Kratt, S. P., Polemeno, R., Litt, M., & Worton, R. G. (1989). Assignment of the gene for X-linked congenital stationary night blindness (Csnb1) to human-chromosome Xp11.3. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 51, 1049-1050.

- Naarendorp, F., & Williams, G. E. (1999). The d-wave of the rod electroretinogram of rat originates in the cone pathway. *Visual Neuroscience*, 16, 91-105.
- Nakajima, Y., Iwakabe, H., Akasawa, C., Nawa, H., Shigemoto, R., Mizuno, N., & Nakanishi, S. (1993). Molecular characterization of a novel retinal metabotropic glutamate receptor mGluR6 with a high agonist selectivity for L-2-amino-4-phosphonobutyrate. *The Journal of Biological Chemistry*, 268, 11868-11873.
- Nathans, J., Thomas, D., & Hogness, D. S. (1986). Molecular genetics of human color vision: The genes encoding blue, green and red pigments. *Science*, 232, 193-202.
- Nelson, R., Famiglietti, E. V., & Kolb, H. (1978). Intracellular staining reveals different levels of stratification for on- and off-center ganglion cells in cat retina. *Journal of Neurophysiology*, 41, 472-483.
- Newman, E. A. (1984). Regional specialization of retinal glial cell membrane. *Nature*, 309, 155-157.
- Newman, E. A., Frambach, D. A., & Odette, L. L. (1984). Control of extracellular potassium levels by retinal glial cell K⁺ siphoning. *Science*, 225, 1174-1175.
- Newman E. A., & Odette L. L. (1984). Model of electroretinogram b-wave generation: a test of the K⁺ hypothesis. *Journal of Neurophysiology*, 51, 164-182.
- Nicholson, L. V., Johnson, M. A., Bushby, K. M., Gardner-Medwin, D., Curtis, A., Ginjaar, I. B., den Dunnen, J. D., Welch, J. L., Butter, T. J., Bakker, E., et al. (1993). Integrated study of 100 patients with Xp21 linked muscular dystrophy using clinical, genetic, immunochemical, and histopathological data. Part 1. Trends across the clinical groups. *Journal of Medical Genetics*, 30, 728-736.
- Nobile, C., Marchi, J., Nigro, V., Roberts, R. G., & Danieli, G. A. (1997). Exon-intron organization of the human dystrophin gene. *Genomics*, 45, 421-424.
- Nomura, A., Shigemoto, R., Nakamura, Y., Okamoto, M., Mizuno, N., & Nakanishi, S. (1994). Developmentally regulated postsynaptic localization of a metabotropic glutamate receptor in rat rod bipolar cells. *Cell*, 77, 361-369.
- O'Brien, K. F., & Kunkel, L. M. (2001). Dystrophin and muscular dystrophy: Past, present, and future. *Molecular Genetics and Metabolism*, 74, 75-88.

- Pascual-Pascual, S. I., Molano, J., & Pascual-Castroviejo, I. (1998). Electroretinogram in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Pediatric Neurology*, 18, 315-320.
- Passos-Bueno, M. R., Bakker, E., Kneppers, A. L., Takata, R. I., Rapaport, D., den Dunnen, J. T., Zatz, M., van Ommen, G. J. (1992). Different mosaicism frequencies for proximal and distal Duchenne muscular dystrophy (DMD) mutations indicate difference in etiology and recurrence risk. *American Journal of Human Genetic*, 51, 1150-1155.
- Petzold, A., & Plant, G. T. (2006). Clinical disorders affecting mesopic vision. *Ophthalmic & Physiological Optics*, 26, 326-341.
- Perlman, I. (1995). The electroretinogram: ERG. In: H. Kolb, E. Fernandez, & R. Nelson (Eds). *Webvision: the organization of the retina and visual system*. Lake City, UT: University of Utah Health Sciences Center.
- Philip, U., Walton, J. N., & Smith, C. A. B. (1956). Colour blindness and Duchenne type muscular dystrophy. *Annual Human Genetics*, 21, 155-158.
- Pilgram, G. S. K., Potikanond, S., Baines, R. A., Fradkin, L. G., & Noordermeer, J. N. (2010). The roles of the dystrophin-associated glycoprotein complex at the synapse. *Molecular Neurobiology*, 41, 1-21.
- Pillers, D. A. M. (1999). Dystrophin and the retina. *Molecular Genetics and Metabolism*, 68, 304–309.
- Pillers, D. A. M., Bulman, D. E., Weleber, R. G., Sigesmund, D. A., Musarella, M. A., Powell, B. R., Murphey, W. H., Westall, C., Panton, C., Becker, L. E. et al. (1993). Dystrophin expression in the human retina is required for normal function as defined by electroretinography. *Nature genetics*, 4, 82-86.
- Pillers, D. A. M., Fitzgerald, K. M., Duncan, N. M., Rash, S. M., White, R. A., Dwinnell, S. J., Powell, B. R., Schnur, R. E., Ray, P. N., Cibis, G. W., & Weleber, R. G. (1999a). Duchenne/Becker muscular dystrophy: correlation of phenotype by electroretinography with sites of dystrophin mutations. *Human Genetics*, 105, 2-9.
- Pillers, D. A. M., Towbin, J. A., Chamberlain, J. S., Wu, D., Ranier, J., Powell, B. R., & McCabe, E. R. (1990a). Deletion mapping of Aland Island eye disease to Xp21 between DXS67 (B24) and Duchenne muscular dystrophy. *American Journal of Human Genetics*, 47, 795-801.
- Pillers, D. A. M., Weleber, R. G., Green, D. G., Rash, S. M., Dally, G. Y., Howard, P. L., Powers, M. R., Hood, D. C., Chapman, V. N., Ray, P. N., & Woodward, V. R. (1999b). Effects of dystrophin isoforms on signal transduction through neural retina: Genotype-phenotype analysis of

Duchenne muscular dystrophy mouse mutants. *Molecular Genetics and Metabolism*, 66, 100-110.

Pillers, D. A. M., Weleber, R. G., Powell, B. R., Hanna, C. E., Magenis, R. E., & Buist, N. R. (1990b). Aland Island eye disease (Forsius-Eriksson ocular albinism) and an Xp21 deletion in a patient with Duchenne muscular dystrophy, glycerol kinase deficiency, and congenital adrenal hypoplasia. *American Journal of Medical Genetics*, 36, 23-28.

Pillers, D. A. M., Weleber, R. G., Woodward, W. R., Green, D. G., Chapman, V. M., & Ray, P. N. (1995). Mdx(Cv3) mouse is a model for electroretinography of Duchenne-Becker muscular-dystrophy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 36, 462-466.

Pugh Jr., E. N., & Lamb, T. D. (2000). Phototransduction in vertebrate rods and cones: molecular mechanisms and amplification, recovery and light adaptation. In A. J. Hoff (Ed.). *Handbook of Biological Physics* (pp. 183-255). Amsterdam: Elsevier Science.

Puwarawuttipanit, W., Bragg, A. D., Frydenlund, D. S., Mylonakou, M. N., Nagelhus, E. A., Peters, M. F., Kotchabhakdi, N., Adams, M. E., Froehner, S. C., Haug, F. M., Ottersen, O. P., & Amiry-Moghaddam, M. (2006). Differential effect of alpha-syntrophin knockout on aquaporin-4 and Kir4.1 expression in retinal macroglial cells in mice. *Neuroscience*, 137, 165-175.

Raviola, E., & Gilula, N. B. (1973). Gap junctions between photoreceptor cells in the vertebrate retina. *Proceedings of the National Academy of Science*, 70, 1677-1681.

Rieke, F., & Baylor, D. A. (1998). Origin of reproducibility in the responses of retinal rods to single photons. *Biophysical Journal*, 75, 1836-1857.

Rieke, F., & Baylor, D. A. (2000). Origin and functional impact of dark noise in retinal cones. *Neuron*, 26, 181-186.

Rodieck, R. W. (1998). *The first steps in seeing*. Sunderland: Sinauer Associates.

Rodius, F., Claudepierre, T., RosasVargas, H., Cisneros, B., Montanez, C., Dreyfus, H., Monet, D., & Rendon, A. (1997). Dystrophins in developing retina: Dp260 expression correlates with synaptic maturation. *NeuroReport*, 8, 2383-2387.

Roque, D. T., Teixeira, R. A. A., Zachi, E. C., & Ventura, D. F. (2011). The use of the Cambridge Neuropsychological Test Automated Battery (CANTAB) in neuropsychological assessment: application in Brazilian research with control children and adults with neurological disorders. *Psychology & Neuroscience*, 4, 255-265.

- Sacco, A., Mourkioti, F., Tran, R., Choi, J., Llewellyn, M., Kraft, P., Shkreli, M., Delp, S., Pomerantz, J. H., Artandi, S. E., & Blau, H. M. (2010). Short telomeres and stem cell exhaustion model Duchenne muscular dystrophy in mdx/mTR mice. *Cell*, 143, 1059-1071.
- Schiller, P. H. (1984). The connections of the retinal on and off pathways to the lateral geniculate nucleus of the monkey. *Vision Research*, 24, 923-932.
- Schiller, P. H. (1992). The ON and OFF channels of the visual system. *Trends in Neuroscience*, 15, 86-92.
- Schiller, P. H. (1995). The ON and OFF channels of the mammalian visual system. *Progress in Retinal and Eye Research*, 15, 173-195.
- Schiller, P. H., Sandell, J. H., & Maunsell, J. H. (1986). Functions of the ON and OFF channels of the visual system. *Nature*, 322, 824-825.
- Schmitz, B., Holbach, M., & Drenckhahn, D. (1993). Colocalization of retinal dystrophin and actin in postsynaptic dendrites of rod and cone photoreceptor synapses. *Histochemistry*, 100, 473-479.
- Schmitz, F., & Drenckhahn, D. (1997a). Dystrophin in the retina. *Progress in Neurobiology*, 53, 547-560.
- Schmitz, F., & Drenckhahn, D. (1997b). Localization of dystrophin and beta-dystroglycan in bovine retinal photoreceptor processes extending into the postsynaptic dendritic complex. *Histochemistry and Cell Biology*, 108, 249-255.
- Schnapf, J. L., Kraft, T. W. & Baylor, D. A. (1987). Spectral sensitivity of the human cone photoreceptors. *Nature*, 325, 439-441.
- Schneeweis, D. M., & Schnapf, J. L. (1995). Photovoltage of rods and cones in the macaque retina. *Science*, 268, 1053-1056.
- Sene, A., Tadayoni, R., Pannicke, T., Wurm, A., El Mathari, B., Bénard, R., Roux, M. J., Yaffe, D., Mornet, D., Reichenbach, A., Sahel, J., & Rendon, A. (2009). Functional implication of Dp71 in osmoregulation and vascular permeability of the retina. *PloS one*, 4, e7329.
- Shapley, R. M., & Perry, V. H. (1986) Cat and monkey ganglion cells and their visual functions roles. *Trends in Neuroscience*, 9, 229-235.
- Sicinski, P., Geng, Y., Rydercook, A. S., Barnard, E. A., Darlison, M. G., & Barnard, P. J. (1989). The molecular-basis of muscular-dystrophy in the mdx mouse - a point mutation. *Science*, 244, 1578-1580.
- Sieving, P. A. (1993). Photopic on- and off-pathway abnormalities in retinal dystrophies. *Transactions of the American Ophthalmological Society*, 91, 701-773.

- Sigesmund, D. A., Weleber, R. G., Pillers, D. A. M., Westall, C. A., Panton, C. M., Powell, B. R., Héon, E., Murphey, W. H., Musarella, M. A., & Ray, P. N. (1994). Characterization of the ocular phenotype of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Ophthalmology*, 101, 856-865.
- Silveira, L. C. L., Saito, C. A., Lee, B. B., Kremers, J., da Silva Filho, M., Kilavik, B. E., Yamada, E. S., & Perry, V. H. (2004). Morphology and physiology of primate M- and P-cells. *Progress in Brain Research*, 144, 21-26.
- Sitnik, R., Campiotto, S., Vainzof, M., Pavanello, R. C., Takata, R. I., Zatz, M., & Passos-Bueno, M. R. (1997). Novel point mutations in the dystrophin gene. *Human Mutation*, 10, 217-222.
- Sterling, P. (2003). How retinal circuits optimize the transfer of visual information. In: L. M. Chalupa & J. S. Werner (Eds.). *The visual neurosciences* (pp. 234-259). Cambridge: MIT Press.
- Stockton, R. A., & Slaughter, M. M. (1989). B-wave of the electroretinogram: A reflection of ON bipolar activity. *Journal of General Physiology*, 93, 101-122.
- Sustar, M., Hawlina, M., & Brecelj, J. (2006). ON- and OFF-response of the photopic electroretinogram in relation to stimulus characteristics. *Documenta Ophthalmologica*, 113, 43-52.
- Tamura, T., Yoshioka, K., Jinno, Y., Niikawa, N., Miike, T. (1993). Dystrophin isoforms expressed in the mouse retina. *The Journal of the Neurological Science*, 115, 214-218.
- Tessier-Lavigne, M. (2000). Visual processing by the retina. In E.R.Kandel, J. H. Schwartz, & T. M. Jessell (Eds.), *Principles of Neural Science* (4th ed., pp. 508-522). New York: McGraw-Hill.
- Tinsley, J. M., Blake, D. J., Pearce, M., Knight, A. E., Kendrick-Jones, J. & Davies, K. E. (1993). Dystrophin and related proteins. *Current Opinion in Genetics & Development*, 3, 484-490.
- Tinsley, J. M., Blake, D. J., Zuellig, R., & Davies, K. E. (1994). Increasing complexity of the dystrophin-associated protein complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91, 8307-8313.
- Thompson, D. A., Feather, S., Stanescu, H. C., Freudenthal, B., Zdebik, A. A., Warth, R., Ognjanovic, M., Hulton, S. A., Wassmer, E., van't Hoff, W., Russell-Eggitt, I., Dobbie, A., Sheridan, E., Kleta, R., & Bockenhauer, D. (2011). Altered electroretinograms in patients with KCNJ10 mutations and EAST syndrome. *Journal of Physiology*, 589, 1681-1689.

- Ueda, H., Baba, T., Kashiwagi, K., Lijima, H., & Ohno, S. (2000a). Dystrobrevin localization in photoreceptor axon terminals and at blood-ocular barrier sites. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 41, 3908-3914.
- Ueda, H., Baba, T., & Ohno, S. (2000b). Current knowledge of dystrophin and dystrophin-associated proteins in the retina. *Histology and Histopathology*, 15, 753-760.
- Ueda, H., Baba, T., Terada, N., Kato, Y., Tsukahara, S., & Ohno, S. (1997a). Dystrophin in rod spherules; submembranous dense regions facing bipolar cell processes. *Histochemistry and Cell Biology*, 108, 243-248.
- Ueda, H., Gohdo, T., & Ohno, S. (1998). β -dystroglycan localization in the photoreceptor and Muller cells in the rat retina revealed by immunoelectron microscopy. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 46, 185-191.
- Ueda, H., Kato, Y., Baba, T., Terada, N., Fujii, Y., Tsukahara, S., & Ohno, S. (1997b). Immunocytochemical study of dystrophin localization in cone cells of mouse retinas. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 38, 1627-1630.
- Ueda, H., Kobayashi, T., Mitsui, K., Tsurugi, K., Tsukahara, S., & Ohno, S. (1995a). Dystrophin localization at presynapse in rat retina revealed by immunoelectron microscopy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 36, 2318-2322.
- Ueda, H., Tsukahara, S., Kobayashi, T., & Ohno, S. (1995b). Immunocytochemical study of dystrophin-related protein in the rat retina. *Ophthalmic Research*, 27, 219-226.
- Vainzof, M., Passos-Bueno, M. R., Takata, R. I., Pavanello, R. C., & Zatz, M. (1993a). Intrafamilial variability in dystrophin abundance correlated with difference in the severity of the phenotype. *Journal of the Neurological Sciences*, 119, 38-42.
- Vainzof, M., Pavanello, R. C., Pavanello Filho, I., Passos-Bueno, M. R., Rapaport, D., Hsi, C. T., & Zatz, M. (1990). Dystrophin immunostaining in muscles from patients with different types of muscular dystrophy: a Brazilian study. *Journal of the Neurological Sciences*, 98, 221-233.
- Vainzof, M., Takata, R. I., Passos-Bueno, M. R., Pavanello, R. C., & Zatz, M. (1993b). Is the maintenance of the C-terminus domain of dystrophin enough to ensure a milder Becker muscular dystrophy phenotype? *Human Molecular Genetics*, 2, 39-42.
- Vainzof, M., & Zatz, M. (2003). Protein defects in neuromuscular diseases. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36, 543-555.

- Vardi, N., Dhingra, A., Zhang, L., Lyubarsky, A., Wang, T. L., & Morigiwa, K. (2002). Neurochemical organization of the first visual synapse. *The Keio Journal of Medicine*, 51, 154-164.
- Vardi, N., Duvoisin, R., Wu, G., & Sterling, P. (2000). Localization of mGluR6 to dendrites of ON bipolar cells in primate retina. *The Journal of Comparative Neurology*, 423, 402-412.
- Vardi, N., Morigiwa, K., Wang, T. L., Shi, Y. J., & Sterling, P. (1998). Neurochemistry of the mammalian cone 'synaptic complex'. *Vision Research*, 38, 1359-1369.
- Vardi, N., & Smith, R. G. (1996). The All amacrina network: coupling can increase correlated activity. *Vision Research*, 36, 3747-3757.
- Varela-Rodríguez, C., Felipe, A., Picaud, S., Sahel, J., & Rendon, A. (2006). The diminution of the b-wave amplitude correlates with an impairment in the high contrast and movement detection in a mouse model of Duchenne Muscular Dystrophy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 47, 3752.
- Ventura, D. F., Gualtieri, M., Oliveira, A. G. F., Costa, M. F., Quiros, P., Sadun, F., de Negri, A. M., Salomão, S. R., Berezovsky, A., Sherman, J., Sadun, A. A., & Carelli, V. (2007). Male prevalence of acquired color vision defects in asymptomatic carriers of Leber's Hereditary Optic Neuropathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 48, 2362-2370.
- Ventura, D. F., Quiros, P., Carelli, V., Salomão, S. R., Gualtieri, M., Oliveira, A. G. F., Costa, M. F., Berezovsky, A., Sadun, F., de Negri, A. M., & Sadun, A. A. (2005). Chromatic and luminance contrast sensitivities in asymptomatic carriers from a large Brazilian pedigree of 11778 Leber Hereditary Optic Neuropathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 46, 4809-4814.
- Ventura, D. F., Simões, A. L., Tomaz, S., Costa, M. F., Lago, M., Costa, M. T., Canto-Pereira, L. H., Souza, J. M., Faria, M. A., & Silveira, L. C. L. (2005). Colour vision and contrast sensitivity losses of mercury intoxicated industry workers in Brazil. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19, 523-529.
- Verbovaia, L. V. & Razin, S. V. (1997). Mapping of replication origins and termination sites in the Duchenne muscular dystrophy gene. *Genomics*, 45, 24-30.
- Viswanathan, S., Frishman, L. J., Robson, J. G., Harwerth, R. S., & Smith III, E. L. (1999). The photopic negative response of the macaque electroretinogram: reduction by experimental glaucoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 40, 1124-1136.

- Viswanathan, S., Frishman, L. J., & Robson, J. G. (2000). The uniform field and pattern ERG in macaques with experimental glaucoma: removal of spiking activity. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 41, 2797–2810.
- Völgyi, B., Deans, M. R., Paul, D. L. & Bloomfield, S. A. (2004). Convergence and segregation of the multiple rod pathways in mammalian retina. *The Journal of Neuroscience*, 24, 11182-11192.
- Wachtmeister, L. (1980). Further studies of the chemical sensitivity of the oscillatory potentials of the electroretinogram (ERG). *Acta Ophthalmologica*, 58, 712-725.
- Wald, G. (1964). Receptor of human color vision. *Science*, 145, 1007-1016.
- Walton, J. N. (1954). On the classification and natural history of the myopathies. *Transactions of the American Neurological Association*, 13, 19-21.
- Wässle, H., & Boycott, B. B. (1991). Functional architecture of the mammalian retina. *Physiological Reviews*, 71, 447-480.
- Wässle, H., Yamashita, M., Greferath, U., Grünert, U., & Müller, F. (1991). The rod bipolar cell of the mammalian retina. *Visual Neuroscience*, 7, 99-112.
- Weleber, R. G., & Eisner, A. (1988). Retinal function and physiological studies. In D. A. Newsome (Ed.). *Retinal Dystrophies and Degenerations*. (pp: 21-69). New York: Raven Press.
- Weleber, R. G., Pillers, D. A., Powell, B. R., Hanna, C. E., Magenis, R. E., & Buist, N. R. (1989). Aland Island eye disease (Forsius-Eriksson syndrome) associated with contiguous deletion syndrome at Xp21. Similarity to incomplete congenital stationary night blindness. *Archives of Ophthalmology*, 107, 1170-1179.
- Wersinger, E., Bordais, A., Schwab, Y., Sene, A., Bernard, R., Alunni, V., Sahel, J., Rendon, A., & Roux, M. J. (2011). Reevaluation of dystrophin localization in the mouse retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52, 7901-7908.
- Westheimer, G., & Campbell, F. W. (1962). Light distribution in the image formed by the living human eye. *Journal of the Optical Society of America*, 52, 1040-1045.
- Wiesel, T. N., & Hubel, D. H. (1966). Spatial and chromatic interactions in the lateral geniculate body of the rhesus monkey. *Journal of Neurophysiology*, 29, 1115-1156.
- Wiesen, M. H. J., Bogdanovich, S., Agarkova, I., Perriard, J., & Khurana, T. S. (2007). Identification and characterization of layer-specific differences in extraocular muscle M-bands. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 48, 1119-1127.

- Wilson, M. (2003). Retinal synapses. In: L. M. Chalupa & J. S. Werner (Eds.). *The visual neurosciences* (pp. 279-303). Cambridge: MIT Press.
- Yoshioka, M., Okuno, T., Honda, Y., & Nakano, Y. (1980). Central nervous system involvement in progressive muscular dystrophy. *Archives of Disease in Childhood*, 55, 589-594.
- Zachi, E. C. (2009). *Avaliação neuropsicológica de pacientes com distrofia muscular de Duchenne*. Tese de doutorado, Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo.
- Zachi, E. C., Costa, M. F., Taub, A., & Ventura, D. F. (2010). Color vision impairment is associated with cognitive deficits in Duchenne Muscular Dystrophy patients. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51, 6302.
- Zachi, E. C., Costa, M. F., Taub, A., & Ventura, D. F. (2011). Color vision impairment is associated with attention and memory deficits in Duchenne muscular dystrophy patients. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52, 4904.
- Zachi, E. C., Taub, A., Costa, M. F., Oiwa, N. N., & Ventura, D. F. (2009). Visual memory in Duchenne muscular dystrophy (DMD). *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 50, 2009.
- Zatz, M., Itskan, S. B., Sanger, R., Frota-Pessoa, O., & Saldanha, P. H. (1974). New linkage data for the X-linked types of muscular dystrophy and G6PD variants, colour blindness, and Xg blood groups. *Journal of Medical Genetics*, 11, 321-327.
- Zatz, M. (2002). A biologia molecular contribuindo para a compreensão e a prevenção das doenças hereditárias. *Ciência & Saúde Coletiva*, 7, 85-99.
- Zatz, M., Lange, K., & Spence, M. A. (1977). Frequency of Duchenne muscular dystrophy carriers. *Lancet*, 1, 759.
- Zatz, M., Vianna-Morgante, A. M., Campos, P., & Diament, A. J. (1981). Translocation (X;6) in a female with Duchenne muscular dystrophy: implications for the localisation of the DMD locus. *Journal of Medical Genetics*, 18, 442-447.
- Zhao, J. E., Uchino, M., Yoshioka, K., Miyatake, M., & Miike, T. (1991). Dystrophin in control and mdx retina. *Brain & Development*, 13, 135-137.

ANEXOS

Anexo A - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP-HU/USP)

São Paulo, 07 de outubro de 2006.

$I^{mo(a)}, S^{r(a)}$.

Profa. Dra. Dora Selma Fix Ventura

Departamento de Psicologia Experimental

Instituto de Psicologia

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

REFERENTE: **Projeto de Pesquisa** “*Estudo eletrofisiológico, psicofísico e neuropsicológico em jovens com Distrofia Muscular de Duchenne*” – **Co-autor(es)**: Prof. Dr. Marcelo Fernandes da Costa, Elaine Cristina Zach, Mirella Telles Salgueiro Barboni - **Registro CEP-HU/USP**: 642/06 – **SISNEP CAAE**: 0026.0.198.000-06

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em reunião ordinária realizada no dia 06 de outubro de 2006, analisou o projeto de pesquisa acima citado, considerando-o como **APROVADO**, bem como, seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final, em função da duração da pesquisa), de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, item IX.2 letra c.

O primeiro relatório está previsto para 06 de outubro de 2007.

Atenciosamente,

Dr. Maurício Seckler
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital Universitário da USP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA USP
Avenida Professor Lineu Prestes, 2565 – Cidade Universitária – 05508-900 – São Paulo – SP
Tels.: (11) 3039-9457 ou 9479 – Fax: (11) 3039-9452 – E-mail: cep@hu.usp.br

Anexo B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (maior de idade)

Universidade de São Paulo
Instituto de Psicologia
Departamento de Psicologia Experimental
Setor de Eletrofisiologia e Psicofísica Visual Clínica

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estudo Eletrofisiológico e Psicofísico da Visão em jovens com Distrofia Muscular de Duchenne

Pesquisadores: Mirella Telles Salgueiro Barboni e Professora Dr^a Dora Selma Fix Ventura (Prof^a Titular responsável pela pesquisa).

Você está sendo convidado(a) a participar, como voluntário, de uma pesquisa que tem o objetivo de verificar e avaliar possíveis alterações visuais causadas pela Distrofia Muscular de Duchenne. O estudo, baseado nos resultados dos exames, será realizado no Laboratório de Eletrofisiologia e Psicofísica Visual Clínica no Departamento de Psicologia Experimental do IPUSP. Os exames não são invasivos e não oferecem qualquer risco de dano físico e/ou psicológico ao participante. Na Distrofia Muscular de Duchenne pode ocorrer redução da atividade de vias que dependem da proteína envolvida na doença (distrofina), por esse motivo justifica-se pesquisar e estudar possíveis alterações em funções visuais que podem estar associadas a essa proteína.

Será realizada uma consulta completa com médico(a) oftalmologista para verificar se há alterações da visão decorrentes de algum problema oftalmológico que não esteja relacionado com a Distrofia Muscular de Duchenne.

No exame de sensibilidade ao contraste e no exame para avaliação das vias Magno e Parvo celulares algumas imagens serão apresentadas num monitor em sala escura, você ficará sentado em frente ao monitor e deverá responder verbalmente, ou através de uma caixa de controle, quando começar a perceber a imagem e quando a imagem não puder mais ser percebida no monitor, ou quando a imagem começa a piscar e quando ela para de piscar no monitor. Não haverá dilatação da pupila e nem contato com seu olho durante esses dois exames.

No exame de Eletroretinograma um colírio será pingado para dilatação da pupila. Durante o exame você ficará sentado em frente a uma cúpula onde aparecerá uma luz piscando para estimular a retina e verificar seu funcionamento. As respostas serão captadas por um eletrodo colocado na parte inferior do olho. Para evitar desconforto durante esse exame será feita anestesia prévia da córnea com uso de colírio anestésico. O eletrodo será descartado após utilização.

Os exames serão realizados no mesmo dia, durante um tempo aproximado de 3 horas.

Sendo voluntário para este estudo:

- Você fica livre para esclarecer quaisquer dúvidas sobre este estudo antes e durante o curso da pesquisa.
- Sua participação no estudo é totalmente voluntária. Você terá a liberdade de se recusar a participar da pesquisa ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer penalização ou prejuízo.

Universidade de São Paulo
Instituto de Psicologia
Departamento de Psicologia Experimental

Setor de Eletrofisiologia e Psicofísica Visual Clínica

- Os resultados serão sigilosos e seu nome não será divulgado. Apenas os dados dos resultados dos exames poderão ser divulgados em publicações científicas.
- Você poderá tomar conhecimento dos resultados obtidos ao final da pesquisa, se desejar.
- As despesas decorrentes da participação na pesquisa, como transporte e alimentação, serão ressarcidas pelo Laboratório.
- Caso seja detectada qualquer alteração grave nos exames, será fornecido relatório detalhado e será dada orientação quanto à necessidade de procurar acompanhamento médico.

“Após ter lido as informações acima (ou alguém ter lido), estou ciente de que o estudo será útil para o conhecimento de possíveis alterações visuais causadas pela Distrofia Muscular de Duchenne e autorizo a utilização dos resultados de meu exame para a análise dos dados e divulgação no resultado da pesquisa”.

Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da USP (CEP-HU)

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 2565 – Cidade Universitária – CEP: 05508-900
São Paulo – SP - Telefones: (11) 3039-9457 ou (11) 3039-9479
E-mail: cep@hu.usp.br.

Assinatura do Participante

Assinatura do Pesquisador

Nome do Participante: _____

Documento de identidade: _____ Data de nascimento: ____/____/____

Endereço: _____

Bairro: _____ Cidade: _____ Estado: _____

CEP: _____ Telefones: _____

Email: _____

São Paulo, ____ de ____ de ____

Anexo C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (menor de idade)

Universidade de São Paulo
Instituto de Psicologia
Departamento de Psicologia Experimental
Setor de Eletrofisiologia e Psicofísica Visual Clínica

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estudo Eletrofisiológico e Psicofísico da Visão em jovens com Distrofia Muscular de Duchenne

Pesquisadores: Mirella Telles Salgueiro Barboni e Professora Dr^a Dora Selma Fix Ventura (Prof^a Titular responsável pela pesquisa).

O seu filho(a) está sendo convidado(a) a participar, como voluntário, de uma pesquisa que tem o objetivo de verificar e avaliar possíveis alterações visuais causadas pela Distrofia Muscular de Duchenne. O estudo, baseado nos resultados dos exames, será realizado no Laboratório de Eletrofisiologia e Psicofísica Visual Clínica no Departamento de Psicologia Experimental do IPUSP. Os exames não são invasivos e não oferecem qualquer risco de dano físico e/ou psicológico ao participante. Na Distrofia Muscular de Duchenne pode ocorrer redução da atividade de vias que dependem da proteína envolvida na doença (distrofina), por esse motivo justifica-se pesquisar e estudar possíveis alterações em funções visuais que podem estar associadas a essa proteína.

Será realizada uma consulta completa com médico(a) oftalmologista para verificar se há alterações da visão decorrentes de algum problema oftalmológico que não esteja relacionado com a Distrofia Muscular de Duchenne.

No exame de sensibilidade ao contraste, visão de cores e no exame para avaliação das vias Magno e Parvo celulares algumas imagens serão apresentadas num monitor em sala escura, o seu filho(a) ficará sentado em frente ao monitor e deverá responder verbalmente, ou através de uma caixa de controle, quando começar a perceber a imagem e quando a imagem não puder mais ser percebida no monitor, ou quando a imagem começa a piscar e quando ela para de piscar no monitor. Não haverá dilatação da pupila e nem contato com seu olho durante esses dois exames.

No exame de Eletroretinograma um colírio será pingado para dilatação da pupila. Durante o exame seu filho(a) ficará sentado em frente a uma cúpula onde aparecerá uma luz piscando para estimular a retina e verificar seu funcionamento. As respostas serão captadas por um eletrodo colocado na parte inferior do olho. Para evitar desconforto durante esse exame será feita anestesia prévia da córnea com uso de colírio anestésico. O eletrodo será descartado após utilização.

Os exames serão realizados no mesmo dia, durante um tempo aproximado de 3 horas.

Sendo responsável pelo voluntário para este estudo:

- Você fica livre para esclarecer quaisquer dúvidas sobre este estudo antes e durante o curso da pesquisa.
- Sua participação no estudo é totalmente voluntária. Você terá a liberdade de se recusar a participar da pesquisa ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer penalização ou prejuízo.

Universidade de São Paulo
Instituto de Psicologia
Departamento de Psicologia Experimental

Setor de Eletrofisiologia e Psicofísica Visual Clínica

- Os resultados serão sigilosos e seu nome não será divulgado. Apenas os dados dos resultados dos exames poderão ser divulgados em publicações científicas.
- Você poderá tomar conhecimento dos resultados obtidos ao final da pesquisa, se desejar.
- As despesas decorrentes da participação na pesquisa, como transporte e alimentação, serão ressarcidas pelo Laboratório.
- Caso seja detectada qualquer alteração grave nos exames, será fornecido relatório detalhado e será dada orientação quanto à necessidade de procurar acompanhamento médico.

“Após ter lido as informações acima (ou alguém ter lido), estou ciente de que o estudo será útil para o conhecimento de possíveis alterações visuais causadas pela Distrofia Muscular de Duchenne e autorizo a utilização dos resultados do exame de meu filho(a) para a análise dos dados e divulgação no resultado da pesquisa”.

Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da USP (CEP-HU)

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 2565 – Cidade Universitária – CEP: 05508-900
São Paulo – SP - Telefones: (11) 3039-9457 ou (11) 3039-9479
E-mail: cep@hu.usp.br.

Assinatura do Participante

Assinatura do Pesquisador

Nome do Participante: _____

Documento de identidade: _____ Data de nascimento: ____/____/____

Endereço: _____

Bairro: _____ Cidade: _____ Estado: _____

CEP: _____ Telefones: _____

Nome dos responsável _____

Email: _____

São Paulo, _____ de _____ de _____