**Universidade de São Paulo
Instituto de Psicologia**

Cristiane Maria Gomes Martins

**Avaliação das vias do sistema visual por
eletrorretinograma e testes psicofísicos na
Distrofia Muscular de Duchenne e na Diabetes
Mellitus tipo 1**

São Paulo

2017

**Universidade de São Paulo
Instituto de Psicologia**

Cristiane Maria Gomes Martins

**Avaliação das vias do sistema visual por
eletroretinograma e testes psicofísicos na
Distrofia Muscular de Duchenne e na Diabetes
Mellitus tipo 1**

Versão original

Tese apresentada ao Programa de Neurociência e Comportamento do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientador: Prof^o. Dr^o. Marcelo Fernandes da Costa.

Co-orientadora: Dr^a Mirella Telles Salgueiro Barboni

São Paulo

2017

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
Dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Gomes Martins, Cristiane Maria

Avaliação das vias do sistema visual por eletrorretinograma e testes psicofísicos na Distrofia Muscular de Duchenne e na Diabetes Mellitus tipo 1 / Cristiane Maria Gomes Martins; orientador Marcelo Fernandes da Costa; co-orientadora Mirella Telles Salgueiro Barboni. -- São Paulo, 2017.

190 f.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento) -- Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, 2017.

1. Retina. 2. Eletrorretinografia. 3. Psicofísica. 4. Distrofia Muscular de Duchenne. 5. Diabetes Mellitus. I. Fernandes da Costa, Marcelo, orient. II. Telles Salgueiro Barboni, Mirella, co-orient. III. Título.

Cristiane Maria Gomes Martins

Avaliação das vias do sistema visual por eletrorretinograma e testes psicofísicos na Distrofia Muscular de Duchenne e na Diabetes Mellitus tipo 1.

Tese apresentada ao Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora. Área de concentração: 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 ao meu marido pelo apoio e participação em todos os momentos e a minha família e amigos que compreenderam os períodos de ausência e sempre me apoiaram.

AGRADECIMENTO

Ao orientador Prof. Dr. Marcelo F. da Costa e a co-orientadora Dr. Mirella T. S. Barboni por confiarem no meu trabalho nesta pesquisa. A Prof. Dora F Ventura que aceitou a minha indicação no projeto.

Aos profissionais da ABDIM e GENOMA que encaminharam os participantes com Distrofia Muscular de Duchenne e auxiliaram com os resultados genéticos desses participantes.

Ao Prof. Dr. Max Damico que doou seu tempo para fazer a avaliação oftalmológica dos participantes com Distrofia Muscular de Duchenne.

As neuropsicólogas Elaine Zachi e Luciana que ajudaram com as avaliações neuropsicológicas dos participantes com Distrofia Muscular de Duchenne.

Aos profissionais da Santa Casa de Misericórdia Dr. Ronaldo Sano, Dra. Juliana e Dra. Helena que realizaram os exames oftalmológicos e sempre estiveram disponíveis.

A todos os participantes, pois sem eles este trabalho não seria possível.

À equipe do Laboratório de Eletroretinografia da Universidade de Erlangen-Nurembergue (ERG Lab- Augenklinik, Friederich- Alexander- Universität Erlangen-Nürnberg), pelos ensinamentos, principalmente ao prof. Dr. Jan Kremers, Dra. Tina Tsai e Me. Avinash Aher.

Aos meus amigos que participaram e ajudaram a tornar este trabalho possível: Balázs Nagy, Valéria Duarte, Valtenice França, Kallene Summer, Diego Nicolini e Lucas Guiral

A todos os colegas do laboratório de visão que sempre estão dispostos a ajudar nos momentos difíceis e nos momentos de descontração.

As agências de pesquisas que tornaram possível o andamento do projeto:

APOIO FINANCEIRO

Bolsa de Doutorado da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – cota Institucional;

Bolsa Doutorado Sandwich no Exterior (SWE)- Alemanha DLR - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) 202551/2014-8;

CNPq 4707 85/2014-4;

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)
2014/06457-5;

FAPESP 2012/ 01115-3 e 2014/26818-2;

FAPESP-Bayerische Hochschulzentrum für Lateinamerika (BAYLAT)
2012/51299-3;

CNPq 490428/2013-4 e CAPES 3263/2013;

FAPESP-Centro de Pesquisa , Inovação e Difusão (CEPID) 2013/08028-1;

CNPq 490428/2013.

PREFÁCIO

O presente projeto foi planejado para dar continuidade aos estudos anteriores que correspondem aos trabalhos de Doutorado de Mirella Telles Salgueiro Barboni (Barboni, 2012) com avaliação da visão em jovens com distrofia muscular de Duchenne. Além disso, foi incluído no estudo a avaliação de pacientes Diabéticos tipo 1 que aplica testes complementares aos aplicados no estudo da doutorando Valéria Duarte Garcia (Garcia 2012).

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).

No período de julho de 2014 até julho de 2015 foi realizado estágio de doutorado sandwiche no laboratório de eletrorretinografia sob a supervisão do Professor Doutor Jan Kremers. O Laboratório encontra-se na Universidade Friedrich-Alexander (Friedrich-Alexander-Universität ou FAU) em Erlangen, Alemanha. Durante o estágio de doutorado, foram realizados dois estudos: um estudo foi dedicado à aplicação de métodos eletrorretinográficos em sujeitos saudáveis, e no outro estudo foram aplicados testes psicofísicos de avaliação visual em dicromatas.

Este estudo faz parte de dois projetos de pesquisa financiados por agência de fomento. O projeto intitulado “Desenvolvimento e aplicação de métodos eletrorretinográficos e psicofísicos para avaliação de mecanismos on e off nas vias visuais de luminância e de oponência cromática na Diabetes Mellitus e na distrofia muscular de Duchenne” foi financiado pela FAPESP (2012/01115-3) e permitiu a compra dos dois equipamentos utilizados para avaliação eletrofisiológica e psicofísica. O outro projeto, intitulado “Desenvolvimento de métodos eletrofisiológicos que permitem a separação funcional das vias visuais em sujeitos normais e em sujeitos com alterações retinianas”, foi financiado pelo CNPq em acordo de cooperação internacional com a agência de fomento BMBF da Alemanha. Ambos os projetos foram coordenados pela Professora Doutora Dora Fix Ventura e pelo Professor Doutor Jan Kremers, no caso do projeto CNPq.

RESUMO

Martins, C.M.G. (2017). Avaliação das vias do sistema visual por eletrorretinograma e testes psicofísicos na Distrofia Muscular de Duchenne e na Diabetes Mellitus tipo 1 (Tese de Doutorado). Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A retina é formada por camadas de células que a estrutura, os contatos sinápticos e as características fisiológicas são específicas para cada tipo de célula. O processamento da informação visual, após a ativação dos fotorreceptores pela luz, ocorre em mecanismos pós-receptoriais que formam diferentes circuitos de processamento, entre eles as vias ON, OFF, de luminância e de oponência cromática. As doenças que afetam a retina podem estar relacionadas com alterações específicas de um determinado circuito, como acontece com a distrofia muscular de Duchenne (DMD) que na alteração do gene *dmd* da retina afeta a comunicação entre os fotorreceptores e as células bipolares, e na diabetes Mellitus (DM) o dano celular ocorre principalmente na camada mais interna da retina. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da DMD e da diabetes Mellitus Tipo 1 (DM1) em diferentes mecanismos visuais. A amostra deste trabalho contou com três grupos: controle com 18 participantes (13,5, $\pm 7,6$), DMD com 9 participantes (16, $\pm 5,9$) e DM1 com 12 participantes (13,8, $\pm 2,5$). Os testes eletrorretinográficos foram aplicados nas condições mesópica, fotópica com estímulos que enfatizam respostas ON ou OFF, e flicker heterocromático (verde-vermelho) em 12Hz (para enfatizar a atividade da via de oponência cromática) e 36Hz (para enfatizar a atividade da via de luminância), e testes psicofísicos com estímulos que enfatizam os mecanismos ON e OFF com contraste de luminância e a via de oponência cromática por um estímulo com contraste cromático (isoluminante) verde-vermelho. O grupo DMD apresentou alteração no tempo de resposta e redução na amplitude da onda-a e onda-b nas condições mesópicas ON e OFF, redução da amplitude da onda-b na condição fotópica ON e alteração da via cromática. Enquanto o grupo DM1 apresentou aumento na amplitude e tempo da ond-a e onda-b das via ON e OFF na condição mesópica, mudança na fase da resposta na via cromática e na via de luminância. Os resultados estão de acordo com diversos estudos anteriores

que mostram que as duas doenças causam alterações funcionais na retina, mas cada doença com características específicas. O presente estudo demonstrou que as duas doenças afetam as vias visuais ON e OFF independente do prejuízo neural ocorrer principalmente nas camadas mais externas ou nas camadas mais internas da retina. A possibilidade de identificar prejuízos funcionais em pacientes sem alteração clínica é uma valiosa ferramenta para o acompanhamento de doenças e para avaliar a eficácia de tratamentos. O presente estudo poderá contribuir para o estabelecimento de novos protocolos mais sensíveis e capazes de identificar alterações assimétricas no caso da DMD ou alterações que precedem o diagnóstico clínico no caso da DM1.

Palavras chave: Retina. Eletrorretinografia. Psicofísica. Distrofia muscular de Duchenne. Diabetes Mellitus

ABSTRACT

Martins, C.M.G. (2017). Visual system pathways evaluation by electroretinogram and psychophysical test in Duchenne Muscular Dystrophy and Type 1 Diabetes Mellitus (Tese de Doutorado). Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The retina is formed by layers of cells that the structure, synaptic contact and physiology characters are specific for each type of this cells. The processing of visual information, after the photoreceptor activation by light is separate by post-receptor mechanisms that constitute the ON, OFF, luminance and chromatic pathways. The retina diseases have specific alteration in this tissue, thus it happens with the Duchenne muscular dystrophy (DMD), that have communication problems among photoreceptors and bipolar cells because of damage in *dmd* gene, and the Diabetes Mellitus (DM) that has cells damage mainly in the inner layer of retina. The purpose of this study was to evaluate the effects of DMD and Type 1 diabetes Mellitus (DM1) on different visual mechanisms. The sample had three groups: control with 18 subjects (13.5, ± 7.6), DMD with 9 subjects (16, ± 5.9) and DM1 with 12 subjects (13.8, ± 2.5). The ERG recordings were applied in of the mesopic and photopic conditions with stimuli that laid emphasis on ON and OFF responses and heterochromatic (red-green) flicker modulation in 12Hz (laid emphasis on chromatic pathway) and 36Hz (laid emphasis on luminance pathway), and psychophysical tests laid emphasis on ON and OFF mechanisms with luminance contrast and the chromatic opponent pathway by stimulus with red-green chromatic contrast (isoluminance). As a result the DMD group presented alteration in the response time and reduction in the amplitude of the a- and b-wave in ON and OFF mesopic conditions, reduction of the amplitude of the a- and b-wave in ON photopic condition and alteration of the chromatic pathway. While the DM1 group showed an increase in the amplitude and time of the a- and b-wave in ON and OFF pathways of the mesopic condition, change in phase of the chromatic pathway and luminance pathway. These results were in agreement with previous studies that showed the two diseases present functional changes in the retina, but each disease with specific characteristics. The present study

showed that two diseases affect the ON and OFF pathways regardless of the neural damage occur mainly in outer layer or inner layer of the retina. The possibility identify functional damage in patients without clinic injuries is the valuable tool for the following the diseases and evaluated treatment efficiency. The present study may contribute to establishment of the new sensitive and able protocols to identify asymmetric changes in DMD or changes that precede the clinical diagnosis in DM1.

Keywords: Retina. Electroretinography. Psychophysics. Duchenne muscular Dystrophy. Diabetes Mellitus.

Lista de figuras

Figura 1: Organização celular na retina. As camadas estão identificadas pelas siglas posicionadas a esquerda da figura e as células com números. Na camada nuclear externa (CNE) estão os corpos celulares dos fotorreceptores (o número 1 é o bastonete e 2 é o cone); Na camada plexiforme externa (CPE) ocorre a primeira sinapse entre os fotorreceptores (1 e 2) e as células horizontais (3) e as células bipolares (4); Na camada nuclear interna (CNI) estão os corpos celulares das células bipolares e horizontais; na camada plexiforme interna estão as sinapse entre células bipolares, amácrinas (5) e células ganglionares (6); a camada de células ganglionares (CCG).22

Figura 2: Sinapse invaginada do fotorreceptor. Na invaginação há contato do fotorreceptor com as células horizontais e bipolares do tipo On. As células bipolares do tipo Off fazem contato com os fotorreceptores fora da invaginação, na base do terminal.25

Figura 3: Via dos sinais de cones que seguem para as células ganglionares tipo parasol. Os cones –L, -M e –S estão representados com as respectivas siglas e de cores diferentes. As células horizontais (H1) e as células bipolares difusas (BD) conectam-se com os três tipos de cone. As células BD passam a informação para as células ganglionares do tipo parasol.27

Figura 4: Via dos cones que seguem para as células ganglionares Midget. Essa é uma via específica e de conexão privada de um cone com uma célula bipolar e uma célula ganglionar. Nesta figura há uma via para cada cone –L e uma via para cone –M. O cone –L que se conecta com célula bipolar midget (MB) e esta com uma ganglionar midget que formará o vermelho On. O cone –M conecta-se a uma célula bipolar midget (MB), células horizontais tipo H1 e esta com uma ganglionar midget que formará o verde Off. Este arranjo caracteriza o sistema de otonência verde-vermelho.28

Figura 5: Via dos sinais de cones que seguem para as células ganglionares pequenas biestratificada. Essa via está envolvida com os sinais do cone-S e células horizontais do tipo H2. A célula ganglionar biestratificada recebe sinais da célula bipolar que se conecta ao cone –S (BB) e da célula bipolar difusa (BD) que se conecta com os cones –L e –M.29

Figura 6: Vias dos sinais dos bastonetes. A esquerda da figura duas vias On (On 1 e On 2) dos bastonetes e a direita da figura as três via Off (Off 1, Off 2 e Off 3). A via que o sinal segue do bastonete para uma célula bipolar bastonete e desta o sinal faz conexão com a célula amácrina (AII) que por sua vez conecta-se a célula bipolar cone On ou Off (On 1 e Off 1). A outra via On e Off dos bastonetes segue um caminho indireto, o próprio bastonete por junção do tipo gap sinaliza um cone e este passa informação para bipolar cone On ou Off e então para a célula ganglionar do tipo On ou Off (On 2 e Off 2). A via Off 3 é

uma conexão direta do bastonete com células bipolar de cones Off e desta para ganglionar Off (modificado de Wässle 2004).30

Figura 7: A) representação da localização do gene da distrofina no cromossomo X. B: localização dos promotores no gene da distrofina; as setas indicam as isoformas; o tamanho do gene em kilobases (Kb); à esquerda no exon 2 os três promotores da Dp 427, os outros promotores são localizados acima do exon 30 (*upstream* 30) C: diferentes isoformas da proteína e suas localizações (modificado de Blake e Kröger 2000).34

Figura 8: localização da distrofina e distroglicano na invaginação do pedículo do fotorreceptor, provável ação na sinapse entre fotorreceptor e célula bipolar e horizontal da camada plexiforme externa da retina (Modificado de Schmitz & Drenckhanhn 1997).35

Figura 9: esquema da relação das alterações vasculares e neurais em caso de hiperglicemia (baseado em Roy et al., 2017).39

Figura 10: Sistema RETIport (Roland Consult Stasche & Finger GmbH, Brandenburg, Alemanha) sistema computadorizado de aquisição de sinais e estimulador de campo total Ganzfeld (Q450SC; Roland Consult).49

Figura 11: representação da modulação da luminância em dente serra. No protocolo mesópico ON a luminância aumentou de 0 para 2 cd/m² rapidamente e diminuiu a luminância de forma linear de 2 para 0 cd/m². Esta modulação foi apresentada em 4 Hz num total de 40 apresentações.52

Figura 12: representação da modulação da luminância em dente serra. No protocolo mesópico OFF a luminância diminuiu de 2 para 0 cd/m² rapidamente e aumentou a luminância de forma linear de 0 para 2 cd/m². Esta modulação foi apresentada em 4 Hz num total de 40 apresentações.52

Figura13: A: representação do estímulo de modulação de contraste nas três diferentes condições (0.0; 0.5; 1.0) para os LEDs verde e vermelho. B: representação da oponência cromática para cada modulação de contraste do estímulo. C: representação da luminância em cada condição de modulação de contraste.54

Figura14: Representação da modulação de contraste entre o LED vermelho (R) e o LED verde (G) em contra fase e com luminância média de 100 cd/m². Na figura A o LED verde variou em 100% de contraste e o LED vermelho permaneceu constante quando a modulação foi igual a 0.0 [$R/(R+G)=0.0$]. Na figura B ambos os LEDs variaram em 50% de contraste quando a modulação foi igual a 0.5 [$R/(R+G)=0.5$]. C; o LED vermelho variou em 100% e o LED verde permaneceu constante quando a modulação foi igual a 1.0 [$R/(R+G)=1.0$].55

Figura 15: Representa a medida da amplitude e tempo implícito da onda-a e onda-b no sinal ERG. As setas verticais representam a amplitude da onda-a (a) e da onda-b (b). As setas horizontais o tempo implícito da onda-a (La) e da onda-b (Lb).56

Figura 16: Representação do estímulo psicofísico ON. As imagens acima (a, b,c e d) representam as fases do estímulo que modula a luminância durante sua apresentação na tela com fundo de luminância média de 34,4 cd/m². A imagem de baixo representa a modulação em dente de serra de cada fase acima, como é um estímulo ON a luminância aumenta abruptamente e diminui lentamente.59

Figura 17: Representação do estímulo psicofísico OFF. As imagens acima (a, b,c e d) representam as fases do estímulo que modula a luminância durante sua apresentação na tela com fundo de luminância média de 34,4 cd/m². A imagem de baixo representa a modulação em dente de serra de cada fase acima, como é um estímulo OFF a luminância diminui abruptamente e aumenta lentamente.60

Figura 18: Sinal de um indivíduo de cada grupo: controle, DMD e DM1. A figura da esquerda é o sinal individual da condição mesópica ON e a figura da direita é o sinal individual da condição mesópica OFF.63

Figura19: Gráfico dos resultados mesópico ON onda-a para os três grupos: controle(1), DMD(2) e DM1(3). A: Amplitude da onda-a, o asterisco sinaliza o grupo com estatística significativa.B: Tempo implícito da onda-a, o asterisco sinaliza o grupo com estatística significativa.64

Figura 20: Gráfico dos resultados da amplitude da onda-b do mesópico ON nos três grupos: controle(1), DMD(2) e DM1(3). O asterisco sinaliza os resultados estatisticamente significantes.65

Figura 21: Gráfico dos resultados mesópico OFF onda-a para os três grupos: controle, DMD e DM1. A: Amplitude da onda-a, o asterisco sinaliza o grupo com estatística significativa.B: Tempo implícito da onda-a, o asterisco sinaliza o grupo com estatística significativa.67

Figura 22: Gráfico dos resultados da amplitude da onda-b do mesópico OFF nos três grupos: controle, DMD e DM1. O asterisco sinaliza os resultados estatisticamente significantes.68

Figura 23: Ilustração do sinal de um indivíduo de cada grupo: controle, DMD e DM1. A figura da esquerda é o sinal individual da condição fotópica ON e a figura da direita é o sinal individual da condição fotópica OFF.69

Figura 24: Gráfico dos resultados do tempo implícito da onda-a do fotópico ON nos três grupos: controle, DMD e DM1. O asterisco sinaliza os resultados estatisticamente significantes.70

Figura 25: Gráfico dos resultados fotópico ON onda-b para os três grupos: controle, DMD e DM1. A: Tempo implícito da onda-a, o asterisco sinaliza o grupo com estatística significativa. B: Amplitude da onda-a, o asterisco sinaliza o grupo com estatística significativa.71

Figura 26: Ilustração do sinal de um indivíduo de cada grupo: controle, DMD e DM1. A ilustração à esquerda é o sinal individual da condição 0.0, a ilustração central é o sinal na condição 0.5 e a ilustração à direita o sinal na condição 1.0, em 12 Hz.73

Figura 27: Ilustração do sinal de um indivíduo de cada grupo: controle, DMD e DM1. A ilustração à esquerda é o sinal individual da condição 0.0, a ilustração central é o sinal na condição 0.5 e a ilustração à direita o sinal na condição 1.0, em 12 Hz.73

Figura 28: Gráfico dos resultados da amplitude e fase do 1º harmônico para o estímulo HFP em 12 Hz (via cromática). Os três grupos: controle (—●—), DMD (—■—) e DM1 (—▲—) são representados no gráfico acima com valores da mediana da amplitude nas três condições de modulação do estímulo e no gráfico abaixo os valores da mediana da fase nas três condições de modulação do estímulo HFP: 0.0, 0.5 e 1.0.74

Figura 29: Gráfico dos resultados da amplitude e fase do 2º harmônico para o estímulo HFP em 12 Hz (via cromática). Os três grupos: controle (—●—), DMD (—■—) e DM1 (—▲—) são representados no gráfico acima os valores da mediana da amplitude nas três condições de modulação do estímulo e no gráfico abaixo os valores da mediana da fase nas três condições de modulação do estímulo HFP: 0.0, 0.5 e 1.0.76

Figura 30: Gráfico dos resultados da amplitude e fase do 1º harmônico para o estímulo HFP em 36 Hz (via de luminância). Os três grupos: controle (—●—), DMD (—■—) e DM1 (—▲—) são representados no gráfico acima com valores da mediana da amplitude nas três condições de modulação do estímulo e no gráfico abaixo os valores da mediana da fase nas três condições de modulação do estímulo HFP: 0.0, 0.5 e 1.0.77

Gráfico 31: Gráfico dos resultados da amplitude e fase do 2º harmônico para o estímulo HFP em 36 Hz (via de luminância). Os três grupos: controle (—●—), DMD (—■—) e DM1 (—▲—) são representados no gráfico acima os valores da mediana da amplitude nas três condições de modulação do estímulo

e no gráfico abaixo os valores da mediana da fase nas três condições de modulação do estímulo HFP: 0.0, 0.5 e 1.0.79

Figura 32: Gráfico com os valores de sensibilidade em mediana para os testes: contraste cromático. OS três grupos são representado no eixo x: controle (1), DMD (2) e DM1 (3).80

Figura 33: Gráfico com os valores de sensibilidade em mediana para o teste ON. OS três grupos são representado no eixo x: controle (1), DMD (2) e DM1 (3).81

Figura 34: Gráfico apresenta valores de sensibilidade em mediana para o teste OFF. OS três grupos são representado no eixo x: controle (1), DMD (2) e DM1 (3).82

Lista de Tabelas

Tabela 1: lista dos participantes do grupo DMD com idade, DNA e tempo de uso do corticoide.	47
Tabela 2: lista dos participantes do grupo DM1 com idade e tempo de uso de insulina.	47
Tabela 3: Tabela 3: Lista dos participantes do grupo controle com idade e acuidade visual (AV).	48
Tabela 4: Descrição dos valores da mediana (1º quartil; 3ºquartil) das amplitudes e tempos implícitos da onda-a e onda-b do resultado mesópico ON no controle, DMD e DM1. Foram considerados significantes os valores de $p<0,05$	65
Tabela 5: Descrição dos valores da mediana (1º quartil; 3ºquartil) das amplitudes e tempos implícitos da onda-a e onda-b do resultado mesópico OFF, nos três grupos. Os valores de p significantes estão em negrito ($p<0,05$).	68
Tabela 6: Descrição dos valores da mediana (1º quartil; 3ºquartil) das amplitudes e tempos implícitos da onda-a e onda-b do fotópico ON, nos três grupos.	72
Tabela 7: Descrição dos valores da mediana (1º quartil; 3ºquartil) da amplitude e tempo implícito da onda-d do resultado fotópico OFF, nos três grupos.	72
Tabela 8: Mediana e quartis da amplitude e fase do primeiro harmônico do estímulo HFP em 12 Hz para os grupos controle, DMD e DM1.	75
Tabela 9: Mediana e quartis da amplitude e fase do segundo harmônico do estímulo HFP em 12 Hz para os grupos controle, DMD e DM1. Os valores estatisticamente significantes ($p<0,05$) estão em negrito.	76
Tabela 10: Média e desvio padrão da amplitude e fase do primeiro harmônico do estímulo HFP em 36 Hz para os grupos controle, DMD e DM1. Os valores estatisticamente significantes ($p<0,05$) estão em negrito.	78
Tabela 11: Média e desvio padrão da amplitude e fase do segundo harmônico do estímulo HFP em 36 Hz para os grupos controle, DMD e DM1. Os valores estatisticamente significantes ($p<0,05$) estão em negrito.	79
Tabela 12: Descrição dos valores da mediana (1º quartil; 3ºquartil) da sensibilidade ao contraste cromático verde/vermelho para os três grupos: controle, DMD e DM1.	80
Tabela 13: Descrição dos valores da mediana (1º quartil; 3ºquartil) da sensibilidade ao teste ON para os três grupos: controle, DMD e DM1.	81

Tabela 14: Descrição dos valores da mediana (1º quartil; 3ºquartil) da sensibilidade ao teste OFF para os três grupos: controle, DMD e DM1.82

Sumário

1. Introdução	21
1.1 Processamento visual	21
1.1 Distrofia muscular de Duchenne (DMD)	31
1.2 Diabetes Mellitus tipo 1	37
2. Justificativa	42
3. Objetivo	43
3.1 Objetivo geral	43
3.2 Objetivos específicos	43
4. Métodos	44
4.1 Participantes	44
4.2 Elegibilidade	45
4.2 Avaliação eletrofisiológica – ERG	49
4.2.1 Equipamento	49
4.2.2 Preparação para a eletrorretinografia	50
4.2.3 Protocolos	51
4.2.3.1 Mesópico ON e OFF:	51
4.2.3.2 Fotópico ON e OFF	52
4.2.3.3 ERG de <i>Flicker</i> Heterocromático	53
4.2.4 Processamento dos dados	55
4.3 Avaliação Psicofísica	57
4.3.1 Equipamento	57
4.3.2 Procedimento	57
4.3.3 Protocolos	58
4.4 Análises estatísticas	61
5. Resultados	62
5.1 Eletrorretinográficos – ERG	62
5.1.1 Mesópico	62
5.1.2 Fotópico	69
5.1.3 <i>Flicker</i> Heterocromático	72
5.2 Psicofísicos	80
6 Discussão	83

6.1 DMD.....	84
6.2 DM tipo 1	88
6.3 DMD e DM1	93
7 Conclusão	94
REFERÊNCIAS.....	95

1. Introdução

1.1 Processamento visual

A retina é parte do sistema sensorial visual. Possui 10 camadas, formadas por diversos tipos celulares, organizadas de modo que o sinal neural seja enviado por dois tipos de fluxos: vertical e lateral. A via vertical é formada por fotorreceptores, células bipolares e células ganglionares e a via lateral secundária é composta por circuitos de retroalimentação formados por células horizontais e amácrinas. Desta forma, os diferentes grupos celulares permitem a integração de sinais iniciados pelos fotorreceptores que são processados por vias visuais distintas (Wässle, 2004), esta complexidade formam múltiplos “microcircuitos” que têm propriedades fisiológicas de vias visuais paralelas que conectam a retina com diversas estruturas no cérebro (Dacey, 1999).

Os fotorreceptores estão na camada externa da retina, seus corpos celulares ocupam a camada nuclear externa e seus axônios e terminais estão na camada plexiforme externa, onde ocorre o primeiro contato sináptico do sistema visual com os dendritos das células bipolares e das células horizontais. Os corpos celulares das células bipolares e horizontais estão na camada nuclear interna, com as células amácrinas. As sinapses entre as células bipolares e as células ganglionares e amácrinas estão na camada plexiforme interna (para revisão: Lee, Martin, & Grünert, 2010) (figura 1).

Figura 1: Organização celular na retina. As camadas estão identificadas pelas siglas posicionadas à esquerda da figura e as células com números. Na camada nuclear externa (CNE) estão os corpos celulares dos fotorreceptores (o número 1 é o bastonete e 2 é o cone). Na camada plexiforme externa (CPE) ocorre a primeira sinapse entre os fotorreceptores (1 e 2) e as células horizontais (3) e as células bipolares (4). Na camada nuclear interna (CNI) estão os corpos celulares das células bipolares e horizontais. Na camada plexiforme interna estão as sinapses entre células bipolares, amácrinas (5) e células ganglionares (6). A última camada na figura é de células ganglionares (CCG).

Cada célula da retina desempenha uma determinada função no processamento da informação luminosa. Os fotorreceptores são responsáveis pela transdução da informação luminosa em sinal elétrico. Eles podem ser cones ou bastonetes. Os cones e os bastonetes são hiperpolarizados na presença de luz, eles apresentam diferenças anatômicas e funcionais (Brown & Wald, 1964; Baylor, 1987; Wässle & Boycott, 1991).

Há três tipos de cones na retina e cada um possui sensibilidade espectral distinta em uma determinada faixa de comprimentos de onda: comprimentos de onda curtos (pico em ~ 420 nm), médios (pico em ~ 530 nm) e longos (pico em ~ 560 nm). O terminal sináptico do cone (pedículo) possui formato achatado e nele estão presentes mais de uma invaginação (Nathans, Thomas, & Hogness, 1986; Schnapf, Kraft, & Baylor, 1987).

Em níveis de luz diurnos a visão humana é mediada pelos cones, processo denominado fotópico. Os cones são responsáveis pela alta resolução temporal devido à capacidade de renovação rápida do fotopigmento, e alta resolução espacial devido à convergência de poucos cones para um único neurônio de segunda ordem (Rodieck, 1998).

Os bastonetes possuem o mesmo tipo de fotopigmento (rodopsina), portanto possuem apenas uma faixa de sensibilidade espectral que ocorre entre 495 e 500 nm (Bowmaker & Dartnall, 1980). O terminal sináptico do bastonete possui características morfológicas e fisiológicas que o diferencia do terminal sináptico do cone. O terminal, chamado esférula, possui apenas uma invaginação de formato arredondado. Os bastonetes são responsáveis pela sensibilidade em baixos níveis de iluminação, portanto pela condição escotópica. Eles saturam na maior parte da faixa de intensidade luminosa que está normalmente disponível no ambiente e são capazes de sinalizar a absorção de um único fóton (Baylor, Lamb, & Yau, 1979; Rieke & Baylor 1998 e 2000). A resolução temporal dos bastonetes é mais baixa porque, ao contrário dos cones, a renovação do fotopigmento é lenta. A resolução espacial também é baixa devida à convergência de grande número de bastonetes para um único neurônio de segunda ordem (Rodieck, 1998;

Burns & Lamb 2003). Nos níveis intermediários de intensidade luminosa tanto os cones quanto os bastonetes podem funcionar de modo simultâneo. Essa atividade conjunta ocorre na condição mesópica (Buck 2003).

Há dois tipos de sinapses na camada plexiforme externa: invaginada e basal. As sinapses invaginadas são mais complexas que as sinapses basais. A sinapse basal é semelhante às sinapses do sistema nervoso. As sinapses invaginadas são a conexão entre células horizontais e bipolares com o fotorreceptor. Nos cones acontecem essas duas formas de sinapse. As células bipolares ON e as células horizontais se conectam na invaginação do terminal sináptico do cone, enquanto as células bipolares OFF se conectam na sinapse basal (figura 2). Na invaginação dos bastonetes se conectam as células bipolares ON e horizontais (Vardi, Morigiwa, Wang, & Shi, 1998; Morigiwa & Vardi 1999, Vardi et al., 2002) e na base do terminal sináptico dos bastonetes há a conexão das células bipolares OFF dos cones (Hack, Peichl, & Brandstätter, 1999).

Essa primeira sinapse na retina, distribui o sinal visual, que é transformado de luz em sinal neural pelos fotorreceptores, em múltiplas vias. As células horizontais e bipolares OFF são hiperpolarizadas na presença da luz, ao contrário da célula bipolar ON, que é despolarizada na presença de luz. As células bipolares ON e OFF transferem seus sinais para as células ganglionares ON e OFF, respectivamente (Wässle 2004).

Figura 2: Sinapse invaginada do fotorreceptor. Na invaginação há contato do fotorreceptor com as células horizontais e bipolares do tipo ON. As células bipolares do tipo OFF fazem contato com os fotorreceptores fora da invaginação, na base do terminal.

As células horizontais, que estão conectadas aos fotorreceptores na invaginação, são responsáveis por enviar sinais de retroalimentação para os fotorreceptores além de enviar informações para as células bipolares. Desta forma, elas podem inibir ou ativar as células bipolares e os fotorreceptores, desempenhando papel importante na composição da periferia dos campos receptivos das células bipolares e ganglionares (Dacey, 1999). Além disso, os primeiros estágios do processamento cromático ocorrem na camada externa da retina, por tal, as células horizontais estão relacionadas com o processamento de informações dos cones (Dacey, Lee, Stafford, Pokorny, & Smith, 1996). Há dois tipos de células horizontais: H1 e H2. As células H1 são sensíveis ao aumento de luminância e à excitação dos cones L e M (Chan & Grünert, 1998; Godchild, Chan, & Grünert, 1996). A célula H2 comunica-se com o cone S e promove algumas conexões com os cones L e M. Ainda não é muito claro qual o papel das células H1 e H2 no sistema cromático, entretanto, há indícios de que elas podem colaborar com esse tipo de processamento (para revisão: Lee et al., 2010).

Os dendritos das células bipolares recebem as informações dos fotorreceptores, e seus axônios enviam essa informação para as células ganglionares e amácrinas. Existem dois tipos principais de células bipolares: tipo ON e OFF que respondem, respectivamente, ao aumento e a diminuição da luminância comparada com a luminância média geral (Rodieck, 1998; Buck,

2003; para revisão: Lee et al., 2010). As células bipolares ON e OFF apresentam diferentes tipos de receptores de glutamato em seus dendritos. A célula bipolar do tipo ON possui receptor metabotrópico para glutamato (mGluR6) que permite inverter a polaridade do sinal recebido dos fotorreceptores, assim a célula é despolarizada na presença de luz; e as células bipolares do tipo OFF apresentam receptores ionotrópicos para glutamato (Nelson et al. 1978, Nakajima et al., 1993; Nomura et al., 1994, Morigiwa & Vardi 1999, Vardi et al., 2002). Cada um desses receptores de glutamato possui cinética própria. Desta maneira as células OFF respondem de forma seletiva para componentes temporais diferentes (DeVries, 2000). Além disso, essas células hiper-polarizam na presença de luz, pois conservam a polaridade do sinal enviado pelos fotorreceptores (Sterling, 2003; Wilson, 2003).

Os cones dão origem a circuitos diferentes dependendo do tipo de célula ganglionar a que se conectam: parasol, anã e a pequena biestratificada. As células ganglionares do tipo parasol recebem sinais predominantemente dos cones L e M, que sinalizam as células bipolares difusas. Esta via está relacionada com informação não oponente dos cones L e M e, portanto estão relacionadas com o processamento da informação de luminância guiado pela via magnocelular (Boycott & Wässle, 1991; Dacey 1999). As células ganglionares parasol projetam para a camada magnocelular do núcleo geniculado lateral (NGL) (para revisão: Lee et al., 2010) (figura 3).

Figura 3: Via dos sinais de cones que seguem para as células ganglionares tipo parasol. Os cones L, M e S estão representados com as respectivas siglas e de cores diferentes. As células horizontais (H1) e as células bipolares difusas (BD) conectam-se com os três tipos de cone. As células BD passam a informação para as células ganglionares do tipo parasol.

As células ganglionares do tipo anãs recebem sinais de uma única célula bipolar anã que se conecta a um cone, como uma linha privada para o SNC, este tipo de conexão ocorre na retina central (Calkins Scheln, Tsukamoto, & Sterling, 1994; Wässle, 2004). Os cones L ou M se comunicam com as células bipolar anã do tipo ON ou do tipo OFF, e estas transmitem a informação para células ganglionares anãs do mesmo tipo. Este arranjo possibilita sinais oponentes entre os cones L e M, importante para a função da via cromática. As células ganglionares anãs projetam para a camada parvocelular do NGL (Lee, Valberg, Tigwell, & Tryti, 1987; Dacey, 1999) (Figura 4).

Figura 4: Via dos cones que seguem para as células ganglionares anãs. Essa é uma via específica e de conexão privada de um cone com uma célula bipolar e uma célula ganglionar. Nesta figura há uma via para cada cone L e uma via para cone M. O cone L que se conecta com célula bipolar anã (MB) e esta, com uma ganglionar anã que formará o vermelho ON. O cone M conecta-se a uma célula bipolar anã (MB), células horizontais tipo H1 e esta, com uma ganglionar anã que formará o verde OFF. Este arranjo caracteriza o sistema de oponência verde-vermelho.

Outro tipo de célula ganglionar, as pequenas biestratificadas estão relacionadas com sinais dos cones S e das células horizontais tipo H2 (Dacey & Lee, 1994). As células ganglionares pequenas biestratificadas são excitadas pelos sinais da via do cone S que ativa células bipolares biestratificada do tipo ON e inibidas através das células bipolares difusas do tipo OFF que seguem via dos cones L e M (Dacey & Packer, 2003) (figura 5).

Figura 5: Via dos sinais de cones que seguem para as células ganglionares pequenas biestratificada. Essa via está envolvida com os sinais do cone-S e células horizontais do tipo H2. A célula ganglionar biestratificada recebe sinais da célula bipolar que se conecta ao cone -S (BB) e da célula bipolar difusa (BD) que se conecta com os cones -L e -M.

A informação ON e OFF iniciada pelos bastonetes são processadas por vias diferentes, algumas delas pouco específicas. Os sinais OFF dos bastonetes são classicamente encaminhados indiretamente para as células ganglionares. Na via ON, o bastonete se comunica com a célula bipolar do bastonete (tipo ON), mas essa não se conecta diretamente com a célula ganglionar. Há um tipo específico de célula amácrina que faz a transferência da informação entre a célula bipolar do bastonete e esta envia os sinais para as células ganglionares. A via OFF dos bastonetes não é direta, a célula amácrina do tipo II é considerada pivô na transmissão dos sinais dos bastonetes para as células ganglionares (Dacey, 1999, Blommfield & Dacheux, 2001).

Em outra via os bastonetes se comunicam com os cones através de sinapses elétricas (*gap junction*). Os cones, por sua vez, enviam a

informação para as células bipolares ON e, em seguida, para as células ganglionares (figura 6). Esse trajeto permite que a informação do bastonete seja transferida para o cone e este envia o sinal para a célula ganglionar (Dacey, 1999; Wässle 2004). Por fim, a informação dos bastonetes pode ser enviada diretamente através de uma conexão direta dos bastonetes com as células bipolares OFF dos cones (Völgyi, Deans, Paul, & Bloomfield, 2004) (Figura 6).

Figura 6: Vias dos sinais dos bastonetes. A esquerda da figura duas vias ON (ON 1 e ON 2) dos bastonetes, e a direita da figura, as três via OFF (OFF 1, OFF 2 e OFF 3). A via que o sinal segue do bastonete para uma célula bipolar bastonete e desta o sinal faz conexão com a célula amácrina (All) que por sua vez conecta-se a célula bipolar cone ON ou OFF (ON 1 e OFF 1). A outra via ON e OFF dos bastonetes segue um caminho indireto, o próprio bastonete por junção do tipo gap sinaliza um cone e este passa informação para bipolar cone ON ou OFF e então para a célula ganglionar do tipo ON ou OFF (ON 2 e OFF 2). A via OFF 3 é uma conexão direta do bastonete com células bipolar de cones OFF e desta para ganglionar OFF (modificado de Wässle, 2004).

As células e vias da retina possuem papel definido no processamento da informação luminosa. Apesar da complexidade nas interações entre as células para o processamento da informação, algumas doenças afetam mecanismos visuais específicos. Portanto, é possível relacionar resultados de testes eletrofisiológicos e psicofísicos da visão com a respectiva via, pois integridade nos diferentes níveis é necessária para um determinado mecanismo visual funcionar adequadamente.

É possível avaliar a integridade das vias visuais descritas utilizando-se protocolos baseados nas características fisiológicas. Este estudo avaliou o mecanismo ON e OFF por estímulos programados em onda de dente

de serra. Assim, no estímulo ON há rápido aumento da intensidade luminosa seguida da diminuição gradual da intensidade, e no estímulo OFF, a luz diminui rapidamente de intensidade seguida do aumento gradual da intensidade. Na avaliação da via de luminância e oponência cromática é utilizado o método de duas diferentes frequências temporais em modulação heterocromática (do inglês “Heterochromatic flicker modulation”-HFM) (Kremers, Rodrigues, Silveira & Silva-Filho, 2010). Neste método o estímulo consta apenas com a luz verde e vermelha que modulam senoidalmente em contrafase, de forma que na frequência temporal de 12 Hz o sistema visual responde para oponência de cor (via cromática), e em 36 Hz, o sistema responde para diferença de luminância (via de luminância). Os protocolos mencionados são descritos detalhadamente na metodologia.

1.1 Distrofia muscular de Duchenne (DMD)

As distrofias musculares foram definidas por Walton (1954) como doenças hereditárias e caracterizadas pela atrofia e fraqueza muscular progressiva devido à degeneração do tecido muscular. As distrofias musculares variam na idade do início dos sinais e sintomas, no grau de severidade e no grupo muscular afetado. Dentre elas a distrofia muscular de Duchenne (DMD) é a mais comum (Dalkilic & Kunkel, 2003; Hoffman et al., 2011). A DMD é uma doença genética ligada ao cromossomo X, marcada pela perda muscular progressiva. A distrofina está presente em todo tecido muscular, portanto atinge tanto a musculatura estriada quanto a lisa. Há considerável variabilidade clínica e heterogeneidade genética da doença. O locus afetado na DMD é o Xp21 (região 21 do braço curto do cromossomo sexual X) que é responsável pela produção da proteína distrofina, afetando também o funcionamento de outras proteínas dos complexos proteico no qual está inserida (Martinville et al., 1985; Campbell, 1995; Emery, 1989; Blake, Weir, Newey & Davie, 2002; Emery, 2002). Por se tratar de uma alteração ligada ao gene X, os membros

femininos da família são frequentemente apenas portadores do gene alterado. A mãe portadora pode transmitir essa herança genética para ambos os filhos e filhas. O filho tem 50% de chance de ter o gene alterado e desenvolver a doença, a filha tem 50% de chance de ter o gene alterado, e apesar de não desenvolver a doença, será portadora.

A maioria dos estudos da distrofina e de como ela atua no organismo estão relacionados com a função desta proteína no tecido muscular, mais precisamente na função do complexo proteico na estrutura do citoesqueleto da membrana plasmática muscular. Esta alteração muscular causa comprometimento do aparelho locomotor e sistema cardiorrespiratório, afetando progressivamente a funcionalidade destes tecidos, resultando em óbito antes da 3ª década de vida (Blake & Kroger, 2000; Dooley, Gordon, Dodds, & MacSween, 2010).

Sua incidência é de aproximadamente 1:3500 nascidos vivos do sexo masculino (Blake & Kroger, 2000; Emery, 2001; Dooley, Gordon & Mac Sween, 2010). Geralmente o gene recessivo é transmitido da mãe portadora para o filho, mas em um terço dos casos a etiologia é por mutações novas (Barbujani et al., 1990; Zatz, Lange, & Spence, 1977). O tipo de alteração genética mais comum são as deleções e duplicações do gene da distrofina (Verbovaia & Razin, 1997; Sitnik et al., 1997; Baugmgartner & Ruiz, 2008).

Os estudos mostram que isoformas menores da proteína distrofina encontram-se em outros tecidos do organismo além do tecido muscular (Rapaport et al., 1992). Consequentemente, as alterações do gene da distrofina podem causar algum grau de disfunção em outros tecidos.

O gene da distrofina é considerado o maior entre os 30 mil genes do genoma humano – representa 0,1% do genoma humano (Human Genome Project). Ele é formado por 79 exons com uma grande região codificadora (Bettecken, Müller, & Bernardi, 1992). Um gene com uma grande região codificadora explica a presença de subprodutos em muitos tecidos do organismo humano. Portanto, é preciso muitos estudos para se identificar quais

os tecidos afetados e as consequências fisiológicas de cada tipo de alteração deste gene.

O gene da distrofina é composto por sete promotores do cromossomo X. Entre eles três são responsáveis pela transcrição da proteína completa (Dp 427): B, M e P. As letras indicam o local de expressão da proteína, então B=*brain*, M=*muscle* e P=*Purkinje cell*. Assim, cada promotor está associado à respectiva proteína que expressa: Dp 427 (B), Dp 427 (M) e Dp 427 (P) (Blake et al., 2002). Os outros quatro promotores são responsáveis pelas isoformas menores: Dp 260, Dp 140, Dp 116 e Dp 71 (Ahn & Kunkel, 1993; Muntoni, Torelli, & Ferlini, 2003) (figura 7). Na figura 7B no exon 2 estão os três promotores da Dp 427 e os outros promotores são localizados após o exon 30. No SNC o termo gene da distrofina é citado como gene *dmd*.

Alguns subprodutos do gene *dmd* são encontrados no SNC, portanto sua disfunção ou ausência pode resultar em alterações nas sinapses do SNC (Waite, Brown, & Blake, 2012). Estudos mostram redução da capacidade cognitiva na DMD (Schmitz & Drenckhahn, 1997; Mehler, 2000; Blake & Kröger 2000; Zachi, 2009).

Figura 7: A) representação da localização do gene da distrofina no cromossomo X. B) representação dos 79 exons e localização dos promotores no gene da distrofina; as setas indicam as isoformas; à esquerda no exon 2 os três promotores da Dp 427, os outros promotores são localizados acima do exon 30 (*upstream* 30). C) diferentes isoformas da proteína e suas localizações (modificado de Blake & Kröger, 2000).

A isoforma Dp260 só é encontrada na retina, até o momento. Sua ausência causa alteração na onda-b de sinais eletroretinográficos (ERG) em pacientes com DMD, indicando prejuízo na comunicação entre fotorreceptores e células bipolares ON da retina (Schmitz & Drenckhahn 1997). Sabe-se que a Dp260 está relacionada com a comunicação sináptica na camada plexiforme externa (D'Souza et al., 1995; Satz & Campbell, 2008). A figura 8 representa a localização do complexo da distrofina na comunicação sináptica na camada plexiforme externa da retina que é pré-sináptica, ou seja, no fotorreceptor.

Figura 8: localização da distrofina e distroglicano na invaginação do pedículo do fotorreceptor, provável ação na sinapse entre fotorreceptor e célula bipolar e horizontal da camada plexiforme externa da retina (Modificado de Schmitz & Drenckhanhn 1997).

Recentemente é encontrada expressão do RNA mensageiro da isoforma Dp427, Dp260 e Dp140 na retina na retina de roedores. Essas três isoformas estão presentes tanto na camada nuclear externa (CNE) como na camada nuclear interna (CNI) da retina. A Dp260 é mais expressa na CNE seguida da Dp140 e da Dp427. E o oposto ocorre na CNI que tem mais Dp427 expressa seguida das Dp140 e Dp260 (Wersinger et al., 2011). Estes resultados mostram que a distrofina não está restrita a retina externa, portanto pode afetar diferentes funções visuais.

Em modelo animal a Dp71 está relacionada com a fisiopatologia da DMD porque é expressa em diversos tecidos. A sugestão mais recente é que esta isoforma está envolvida com alteração cognitiva e disfunções retinianas. Na retina a Dp71 é encontrada na camada interna, expressa pelas células de Müller. Estas células estão relacionadas com a manutenção do tecido retiniano (homeostase), assim a alteração da Dp 71, em modelo animal, torna a retina vulnerável (Tadayoni, Rendon, & Soria-Jasso, 2012).

No sistema visual a DMD causa alterações eletrofisiológicas retinianas tanto em modelos animais DMD quanto em pacientes de DMD (Cibis, Fitzgerald, Harris, Rothberg & Rupanis, 1993; Pillers et al., 1995; Drenckhahn, Holbach, Ness, Schmitz, & Anderson, 1996; Schmitz & Drenckhahn, 1997, Barboni et al., 2013, Barboni et al., 2016; Tsai et al., 2016). O ERG negativo (razão entre as amplitudes da onda-b sobre onda-a menor do que 2) evidencia o funcionamento normal dos fotorreceptores e células bipolares, indicando alteração na transmissão sináptica entre essas células (Cibis & Fitzgerald, 2001). No trabalho de Barboni e colaboradores (2013) a onda-b no ERG mesópico, com estímulos designados para enfatizar a atividade dos mecanismos ON e OFF separadamente, estava reduzida nos pacientes com DMD em relação aos controles. As alterações da onda-b do ERG fotópico utilizando flash de longa duração para medida dos sinais ON e OFF sugerem disfunção da comunicação entre fotorreceptores e células bipolares do tipo ON (Fitzgerald et al., 1994). Esta alteração se correlaciona com a presença da distrofina na invaginação do pedículo sináptico dos cones, local dos contatos sinápticos entre fotorreceptores e células bipolares do tipo ON.

Além dos achados eletrofisiológicos, os pacientes com DMD apresentam alteração em testes psicofísicos de avaliação da visão de cores e redução na sensibilidade ao contraste (Costa, Ventura, Pavanello, Cerqueira, & Zatz, 2004; Costa, Oliveira, Feitosa-Santana, Zatz, & Ventura, 2007; Costa, Barboni, & Ventura, 2011). Além disso, quando analisado de modo a enfatizar o mecanismo visual ON ou o mecanismo visual OFF, pacientes com DMD apresentam redução da sensibilidade ao contraste positivo (ON), ou seja, quando há incremento de luminância em relação à luminância de fundo (Barboni et al., 2013).

Estudos em modelos animais confirmam que a distrofina está presente 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, 1997; Ueda et al., 1997 a e b; Ueda, Baba, Kashiwagi, Lijima, & Ohno, 2000a; Ueda, Baba, & Ohno, 2000b; Satz &

Campbell, 2008) e que ela é indispensável para a geração de respostas eletrofisiológicas normais em modelos animais e em humanos (Cibis et al., 1993; Pillers et al., 1995; Fitzgerald et al., 1994) e para funções visuais normais como a visão de cores e de contraste (Costa et al., 2007; Costa et al., 2011; Barboni et al., 2013).

Apesar de novas evidências sobre a presença de isoformas da distrofina em regiões da camada interna da retina de roedores, a Dp 260 ainda é a mais relacionada com as disfunções visuais na DMD e é encontrada predominantemente na camada plexiforme externa da retina.

1.2 Diabetes Mellitus tipo 1

A Diabetes Mellitus (DM) é uma doença metabólica que acarreta a deficiência relativa ou absoluta na produção ou absorção de insulina. É um dos maiores problemas de saúde no mundo, pois afeta um grande número de pessoas, causando incapacitação física e mortalidade prematura (OMS, 2015).

Há diferentes tipos e formas de se classificar a DM, a mais utilizada é a classificação em duas formas principais: Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) e tipo 2 (DM2).

A DM2 é o resultado de uma deficiência progressiva da secreção de insulina devido à interação do estilo de vida, predisposição genética e fatores de risco no ambiente (Neel, 1962; American Diabetes Association, ADA, 2009; Tuomilehto et al., 2001). A DM1 (insulino dependente) tem manifestação precoce, acomete principalmente crianças e jovens adultos e é o tipo menos comum, corresponde de 5% a 10% dos casos detectados. Desencadeada por uma reação autoimune, o sistema de defesa do corpo ataca as células β que produzem insulina (American Diabetes Association, ADA,

2009). O desenvolvimento da DM1 está relacionado com fatores genéticos juntamente com estilo de vida. Neste estudo abordaremos apenas a DM1.

A DM é uma doença sistêmica e as consequências desta afecção estão divididas em dois grupos: macrovasculares (doença isquêmica cardíaca, acidente vascular encefálico e doença vascular periférica) e microvascular (retinopatia, nefropatia e neuropatia) (Aroca - Romero et al., 2008).

A DM ocasiona alterações nos vasos responsáveis pela irrigação sanguínea da retina (alterações microvasculares) e como consequência desenvolve a Retinopatia Diabética (RD). Essas alterações nos capilares são decorrentes do estresse oxidativo no tecido (Fong, Aiello, Gardner, King, & Blankenship, 2004). Assim a RD é classificada clinicamente como uma doença microvascular, mas seu mecanismo na retina não está esclarecido (Kern & Berkowitz, 2015).

O estresse oxidativo é a principal resposta do organismo à DM, afetando a manutenção dos tecidos de todo o organismo (Barber, Gardner, & Abcouwer, 2011; Nakahara, Kurauchi, Sakamoto, & Ishii, 2013). Sabe-se que o desenvolvimento da RD está relacionado com múltiplos fatores que desencadeiam o estresse oxidativo, entre eles a liberação de lipídeos pró-inflamatórios, alterações epigênicas (metabolismo mitocondrial) e disfunções da insulina (Du, Veenstra, Palczewski, & Kern, 2013; Kern & Berkowitz, 2015; Roy, Kern, Song, & Stuebe, 2017).

Além disso, as evidências apontam que as propriedades vasculares da retina são similares às propriedades vasculares do cérebro, por isso as células neurais da retina também podem estar envolvidas na manutenção do tecido retiniano (Barber et al., 2011; Barber, 2015). Há neurodegeneração na camada interna da retina tanto em pesquisas com modelos animais de DM quanto em seres humanos com DM (Barber et al. 1998, El-Asar, Dralands, Missotten, Al-Jadaan, & Geboes, 2004, van Dijk et al., 2010). Esses indícios também relacionam o estresse oxidativo como causa do dano neural e que essa pode ser uma fase inicial da retinopatia diabética, ou

seja, esse dano neural pode anteceder os danos vasculares (Du et al., 2013). Sendo assim a DM desencadeia na retina dano em dois de seus componentes: neural e vascular (Zemel, 2002; Barber et al., 2011; Gualtieri, Feitosa-Santana, Lago, Nishi, & Ventura, 2013). A relação de causa-efeito entre os danos vasculares e a degeneração neural na DM precisa de maiores esclarecimentos (Nakahara et al. 2013).

A DM ocasiona alterações metabólicas no tecido retiniano que interferem na homeostase vascular e neural. Independente de qual alteração acontece primeiro, as evidências são claras de que esses dois mecanismos da doença ocorrem na RD (figura 9).

Figura 9: Esquema da relação das alterações vasculares e neurais em caso de hiperglicemia (baseado em Roy et al., 2017)

Mesmo não existindo uma concordância sobre como, e o que ocorre primeiro, a alteração neural pode anteceder o dano vascular, pois as células gliais e as células ganglionares têm influência na manutenção da regulação do fluxo sanguíneo na retina (Nakahara et al., 2013; Du et al., 2013). Outro fato que colabora com a hipótese do dano neural anteceder o dano vascular é a sugestão de que o excesso de glicose na retina tem ação indireta no endotélio, e o aumento da sua concentração no meio extracelular age primeiro nas células neurais que liberam fatores e estes causam danos ao endotélio da retina (Busik, Mohr, & Grant, 2008).

A alteração do componente neural da retina antecedente ao dano vascular é uma forte evidência para explicar as alterações de visão de cores e sensibilidade ao contraste em pacientes diabéticos sem retinopatia diabética.

As alterações das funções visuais e dos resultados de eletrorretinograma na DM são relatadas em muitos estudos. Segundo a revisão de Lieth e colaboradores (2000), a alteração mais comum é o aumento do tempo implícito de potenciais oscilatórios (PO) dos pacientes com DM sem retinopatia diabética. Os resultados do ERG escotópico e fotópico mostram redução na amplitude e tempo implícito dos PO e no flicker em pacientes de DM 1e DM2 (Holopigian, Seiple, Lorenzo, & Carr, 1992). Além do atraso e diminuição da amplitude de resposta no ERG multifocal em pacientes de DM1 e DM2 (Kurtenbach Schiefer, Neu, & Zrenner, 1999; Klemp et al. 2005, Gualtieri 2008, Garcia 2012).

A sensibilidade ao contraste no DM1 mostra redução da sensibilidade em baixas e médias frequências espaciais (Di Leo et al., 1992; Garcia, 2011). Em outros estudos a redução é observada em todas as frequências espaciais (Dosso et al., 1996; Liska & Dostalek, 1999; Gualtieri, 2004). Pacientes de DM tipo 2 apresentam redução da sensibilidade ao contraste (Gualtieri et al. 2011).

Na visão de cores de pacientes DM1 há deficiência na discriminação de cores (Green et al., 1985; Hardy, Lipton, Scase, Foster, & Scarpello, 1992), presença de defeito de visão difuso no Cambridge Color Test (CCT) em DM tipo 2 (Gualtieri 2004, Santana et al. 2010), com maior perda no eixo tritan (Garcia, 2012). Os resultados nos protocolos Trivector e Ellipses do CCT mostram diferenças significativas entre pacientes diabéticos sem retinopatia e grupo controle (Gualtieri et al., 2013)

A escolha deste grupo experimental para este estudo está relacionada ao dano na camada interna da retina. Seja a alteração principal vascular ou neural, ambas afetam a camada interna.

2. Justificativa

O presente projeto propõe o estudo do sistema visual em duas doenças sistêmicas (Diabetes Mellitus e distrofia muscular de Duchenne) que o acometimento está relacionado com prejuízos nas vias pós-receptorais da retina. Com base em uma literatura diversificada, os métodos de estudo da função visual serão comparados nessas duas doenças sob a suposição de que mecanismos pós-receptorais específicos (cromático, de luminância, mecanismos ON e OFF) podem estar afetados em ambas, mas não se sabe se estão igualmente afetados. Os protocolos psicofísicos e eletrofisiológicos utilizados poderão refletir a atividade de diferentes mecanismos visuais e, portanto, permitirão uma avaliação não invasiva da integridade de cada mecanismo visual separadamente.

3. Objetivo

3.1 Objetivo geral

Estudar os efeitos da distrofia muscular de Duchenne e da diabetes Mellitus em diferentes mecanismos visuais pós-receptoriais.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliação do mecanismo visual ON e OFF;
- Avaliação das vias de oponência cromática e via de luminância;
- Contribuir para o conhecimento da fisiopatologia da distrofia muscular de Duchenne e da diabetes Mellitus.

4. Métodos

Todos os participantes (ou responsáveis legais) concordaram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (anexo C) aprovado pelo CEP-HU/USP (parecer número 156.826) autorizando a participação na pesquisa antes das avaliações.

4.1 Participantes

OS participantes foram divididos em três grupos: controle, Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) e Diabetes Mellitus Tipo 1 (DM1). O recrutamento dos grupos experimentais foi realizado nas seguintes instituições:

- DMD: Associação Brasileira de Distrofia Muscular (ABDIM) e do Centro de Pesquisa sobre Genoma Humano e Células-Tronco USP.
- DM1: Ambulatório de retina do departamento de Oftalmologia da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.
- Controle: alunos de graduação e pós-graduação do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo (IP-USP), e alunos da Escola de Aplicação da Universidade de São Paulo (EA-USP).

Todos os pacientes e voluntários do grupo controle foram submetidos à avaliação oftalmológica completa incluindo a medida de acuidade visual, refração, biomicroscopia e fundoscopia. Além disso, os pacientes do grupo DM1 realizaram o exame de angiofluoresceínografia, padrão ouro para detecção de retinopatia diabética (classificação Diabetic Retinopathy Study – DRS, 1981), no próprio serviço de oftalmologia da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.

Após o recrutamento e seleção dos grupos, estes foram encaminhados para a realização dos testes visuais na USP, após serem informados sobre a pesquisa e concordarem com a participação no estudo.

4.2 Elegibilidade

Ao todo foram selecionados 32 pacientes do grupo DMD (ABDIM: 20 e Genoma: 12), não foi possível contato com três famílias, dois foram excluídos por apresentar alteração genética não detectável ao exame de DNA. Participaram dos testes eletrorretinográficos 10 DMD, pois do total de participantes, dois foram excluídos devido à catarata, um foi excluído por uso de medicamento que poderia comprometer os resultados dos testes, dois foram excluídos por arritmia e quatro recusaram-se a realizar o teste. Nos testes psicofísicos 13 pacientes com DMD foram incluídos, do total de 15, um não retornou para fazer os testes e três foram excluídos pelos resultados cognitivos (IQ e Raven) aplicados pela neuropsicóloga do laboratório de visão, o critério de inclusão era ter resultado normal nos testes cognitivos.

O teste de DNA foi fornecido após a finalização da coleta de dados do grupo DMD pela equipe de geneticistas do Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB/USP). Os resultados foram obtidos por reação de MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) que permite identificar deleção ou duplicação do gene na DMD. O teste foi aplicado de acordo com as instruções da empresa que produz o material (MRC-Holland, Amsterdam) e os resultados foram separados por eletroforese capilar. Utilizando o exon 30 como ponto de referência, neste trabalho os participantes com DMD ainda foram divididos em dois grupos: upstream (alterações no gene acima do exon 30) e downstream (alterações do gene abaixo do exon 30). Ao final da coleta conseguimos avaliar 14 pacientes com DMD, sendo que nove no subgrupo downstream 30 e cinco no subgrupo upstream 30. Do subgrupo upstream apenas dois participaram

dos testes eletrorretinográficos, e os outros três participaram apenas dos testes psicofísicos.

Foram incluídos na pesquisa 18 participantes do grupo controle (16,7 ± 7,6 anos), nove participantes do grupo DMD (17,2 anos, ±6) e 12 participantes do grupo DM1 (13 anos, ±3).

Os critérios de elegibilidade foram divididos em critérios gerais (aplicados nos três grupos) e critérios específicos (aplicados para determinados grupos). Os participantes do grupo controle respeitaram os critérios gerais. Os participantes do grupo DMD e DM1 respeitaram os critérios gerais e os específicos. Assim temos os critérios:

- Gerais: acuidade visual de Snellen corrigida 20/20 ou melhor; ausência de doenças oftalmológicas; e ausência de qualquer outra doença sistêmica como insuficiência renal e outras que comprometam o resultado dos testes;
- DMD: ausência de catarata, arritmia, déficit cognitivo e resultado genético;
- DM1: ausência de retinopatia diabética.

As avaliações ocorreram monocularmente em todos os participantes. Para a escolha do olho a ser testado foi utilizada a avaliação da acuidade visual (AV) de Snellen. O melhor olho foi o de escolha para o teste. No caso do participante ter acuidade visual igual nos dois olhos a escolha foi aleatória. Na tabela 1 estão descritas informações dos participantes do grupo DMD quanto à idade, DNA, tempo de uso do corticoide, AV e olho testado.

Tabela 1: Lista dos participantes do grupo DMD com idade, DNA e tempo de uso do corticoide.

Participante	Idade (anos)	DNA	Tipo	Corticóide (anos)
1	15,4	51-52	Deleção	9
2	16,1	46-47	Deleção	7
3	28,7	46-55	Deleção	13
4	14,5	55	Mutação de ponto	9
5	24,3	43-45	Deleção	18
6	16,0	48-52	Deleção	4
7	17,9	44-47	Deleção	10
8	13,0	48-50	Deleção	5
9	9,8	46-47	Deleção	1
10	18,4	3-7	Duplicação	11
11	17,6	3-7	Duplicação	9
12	11,8	3-15	Deleção	5
13	8,3	2	Duplicação	1
14	5,5	2	Duplicação	1
Média (dp)	16 ($\pm 5,9$)			9 ($\pm 4,8$)

A tabela 2 mostra as informações dos 12 participantes do grupo DM1 quanto à idade e tempo de uso da insulina. Apenas um participante não fez os testes eletrorretinográficos.

Tabela 2: lista dos participantes do grupo DM1 com idade e tempo de uso de insulina.

Participante	Idade (anos)	Insulina (anos)
1	14,4	12,7
2	8,1	2,4
3	14,6	1,9
4	14,6	2,1
5	12,0	6,5
6	10,5	4,0
7	12,7	10,5
8	16,0	4,1
9	14,2	1,2
10	13,3	6,6
11	14,2	8,2
12	9,0	7,4
Média (dp)	13,8 ($\pm 2,5$)	6,6 ($\pm 3,6$)

Cada participante do grupo controle realizou os testes psicofísicos e eletrorretinográficos. Esse grupo foi composto por alunos da

Escola de Aplicação, graduação e pós- graduação da USP. A tabela 3 mostra as informações dos participantes do grupo controle.

Tabela 3: Lista dos participantes do grupo controle com idade e acuidade visual (AV).

Participante	Idade (anos)	Acuidade Visual (ETDRS)
1	29,0	20/20
2	18,3	20/20
3	27	20/20
4	27,7	20/20
5	17,6	20/20
6	8,9	20/20
7	13,0	20/20
8	29,0	20/20
9	9,0	20/20
10	7,0	20/20
11	16,0	20/20
12	13,0	20/20
13	14,0	20/20
14	13,0	20/20
15	9,0	20/20
16	13,0	20/20
17	11,0	20/20
18	26,0	20/20
Média (dp)	13,5 ($\pm$ 7,6)	

As avaliações dos três grupos foram realizadas no Laboratório de Visão – Eletrofisiologia e Psicofísica Visual Clínica do departamento de Psicologia Experimental da Universidade de São Paulo. Pelas características de recrutamento e avaliação, este estudo é classificado como prospectivo e transversal.

4.2 Avaliação eletrofisiológica – ERG

4.2.1 Equipamento

O aparelho utilizado para avaliação eletrorretinográfica foi o sistema RETIport (Roland Consult Stasche & Finger GmbH, Brandenburg, Alemanha) composto por um amplificador e sistema computadorizado de aquisição de sinais, acoplado ao estimulador de campo total Ganzfeld (Q450SC; Roland Consult). O estimulador é composto por seis conjuntos de diodos emissores de luz (LEDs, em inglês) com distribuições espectrais diferentes (figura 10).

Figura 10: Sistema RETIport (Roland Consult Stasche & Finger GmbH, Brandenburg, Alemanha) sistema computadorizado de aquisição de sinais e estimulador de campo total Ganzfeld (Q450SC; Roland Consult).

Os sinais adquiridos e digitalizados pelo sistema foram exportados para o programa Microsoft Office Excel (2007). A frequência de corte baixa foi fixada em 1 Hz e de corte alta em 300 Hz. O tempo de amostragem foi de 1024 ms.

4.2.2 Preparação para a eletrorretinografia

A avaliação foi monocular, a escolha do olho foi baseada na AV mensurada na tabela ETDRS, nos casos que não tiveram diferença entre os olhos na AV a escolha foi aleatória. O olho avaliado dos participantes foi dilatado com uma gota de tropicamida 1% (mydriacyl, ALcon Laboratórios do Brasil LTDA). O participante ficou 20 minutos em adaptação ao escuro após aplicação do colírio.

Para registro do sinal foram utilizados três eletrodos: terra, referência e ativo. Dois eletrodos de cúpula de ouro para eletroencefalograma (EEG) (Gold cup, Grass Technologies) foram utilizados como terra e referência. A fronte e a têmpora ipsilateral foram higienizadas com gel abrasivo (Nuprep, Weaver and Company, Estados Unidos) antes da fixação dos eletrodos. O eletrodo terra foi posicionado na fronte e o referência na têmpora ipsilateral, ambos sobre pasta condutora (Ten20, Weaver and Company, Estados Unidos). O eletrodo de registro foi composto por um filamento unipolar (DTL, UniMed Electrode Supplies), a fibra condutiva foi conectada a um cabo semelhante ao do eletrodo para o EEG (Dawson, Trick & Litzkow, 1979). O DTL foi posicionado na pálpebra inferior do olho testado e fixado no canto nasal e temporal com fita adesiva.

Após o posicionamento dos eletrodos foi verificada a impedância da corrente elétrica entre o eletrodo de registro e o eletrodo terra, assim como entre o eletrodo referência e o eletrodo terra. O valor aceito da impedância foi menor de $5K\Omega$. Caso a impedância estivesse acima desse valor os eletrodos eram retirados e reposicionados com o mesmo procedimento, até alcançar a impedância ideal.

Após os 20 minutos de adaptação ao escuro o participante foi posicionado no Ganzfeld com apoio de queixo e testa do próprio equipamento. A duração de todo o procedimento eletrofisiológico foi, em média, 40 minutos.

4.2.3 Protocolos

Os protocolos do ERG foram: Mesópico ON e OFF com objetivo de estudar as respostas a incremento e decremento de luz, em situação mesópica; Fotópico ON e OFF; com objetivo de estudar as respostas a incremento e decremento de luz, em situação fotópica; *Flicker* Heterocromático, com objetivo de avaliar a via cromática e a via de luminância utilizando o método que permite acessar essas vias com estímulo de modulação senoidal em contrafase de LEDs verde e vermelho, em duas frequências temporais: 12Hz (oponência cromática) e 36Hz (luminância).

4.2.3.1 Mesópico ON e OFF:

A modulação foi em formato de dente de serra com luminância média baixa (1 cd/m² ou 50 Trolands – Td¹). Os protocolos mesópicos foram os primeiros a serem aplicados em todos os participantes dos três grupos, com o sistema adaptado ao escuro. Foram realizadas no mínimo 40 apresentações do estímulo e a resposta final foi a média dos sinais registrados. A frequência temporal foi de 4 Hz (Barboni et al, 2013).

No protocolo ON, a luminância aumentava abruptamente de 0 para 2 cd/m² e diminuía continuamente de forma linear (Figura 10). No protocolo OFF a luminância diminuía rapidamente de 2 cd/m² para 0 e aumentava continuamente de forma linear (Figura 11 e 12).

¹ Troland é uma unidade de iluminação que adentra o globo ocular, calculado pela intensidade de luz e pela área pupilar (Troland, 1917).

Figura 11: representação da modulação da luminância em dente serra. No protocolo mesópico ON a luminância aumentou de 0 para 2 cd/m^2 rapidamente e diminuiu a luminância de forma linear de 2 para 0 cd/m^2 . Esta modulação foi apresentada em 4 Hz num total de 40 apresentações.

Figura 12: representação da modulação da luminância em dente serra. No protocolo mesópico OFF a luminância diminuiu de 2 para 0 cd/m^2 rapidamente e aumentou a luminância de forma linear de 0 para 2 cd/m^2 . Esta modulação foi apresentada em 4 Hz num total de 40 apresentações.

4.2.3.2 Fotópico ON e OFF

No protocolo fotópico a modulação também foi em formato de dente de serra com luminância média alta (60 cd/m^2 ou 3000Td). Esse protocolo foi aplicado após o protocolo mesópico. O número de apresentações do estímulo foi de no mínimo 40 e a resposta final foi a média dos sinais obtidos dessas apresentações. A frequência temporal foi de 4 Hz. No protocolo ON a luminância aumentava rapidamente de 0 para 120 cd/m^2 e diminuía de forma linear. No protocolo OFF a luminância diminuía rapidamente de 120 cd/m^2 para 0 e aumentava de forma linear.

A escolha da modulação de luminância em 4 Hz deve-se ao fato de ser uma frequência temporal suficientemente alta para que o sinal não fosse contaminado por movimentos oculares e/ou palpebrais e suficientemente baixa

para permitir a avaliação dos componentes da resposta no domínio do tempo. Frequências temporais mais altas poderiam sobrepor os ciclos de respostas (Pangeni, Horn, & Kremers, 2010, Pangeni & Kremers, 2013).

4.2.3.3 ERG de *Flicker* Heterocromático

O protocolo ERG de *Flicker* Heterocromático (do inglês *heterochromatic flicker*) já foi utilizado anteriormente (Kremers et al, 2010; Barboni et al, 2010 e 2011; Martins et al, 2016). Este protocolo é a combinação entre o ERG e o estímulo de flicker heterocromático fotômetro (HFP do inglês *heterochromatic flicker photometry*) que permite avaliar *in vivo* a atividade pós receptoral do processamento das informações cromática e de luminância. Estas vias de informação apresentam diferentes propriedades temporais (Dacey et al, 2000; Kremers et al, 2010; Barboni et al, 2011)

HFP é um método para determinar a luminância de um estímulo. Em geral são utilizados dois estímulos coloridos modulados em contra-fase (heterocromaticamente) e em alta frequência temporal. A modulação do estímulo é máxima, obedecendo à lei de contraste de Michelson (100% de contraste) e a luminância média de uma das luzes é alterada pelo observador. As duas luzes são isoluminantes quando o observador tem percepção mínima do *flicker*. Esta técnica tem uma desvantagem, pois a mudança da luminância média de uma das luzes provoca a alteração do estado de adaptação no olho. Uma forma de evitar este problema é a fotometria de modulação heterocromática (Smith & Lutze, 1989). Neste método a luminância média não sofre variação o que varia é a proporção de contraste de cada luz (Kremers et al, 2010).

Este é um protocolo utilizado para captar sinal pós-receptoral na retina com a finalidade de entender melhor o processamento da informação luminosa, envolvendo tanto a modulação do contraste em contrafase de dois

comprimentos de onda, quanto aplicação dessa modulação em duas frequências temporais. A modulação de contraste nos permite criar um estímulo capaz de ter características cromáticas e de luminância e as diferentes frequências temporais permitem que o sinal pós-receptoral nos forneça informação da via cromática e da via de luminância.

A figura 13 representa o estímulo e as suas características de oponência cromática e de luminância em cada da modulação. Na figura A está a representação do estímulo de flicker heterocromático nas três condições de modulação de contraste entre os LEDs verde e vermelho. Na figura B representação arbitrária da oponência cromática e na C a representação da diferença de luminância nas três condições de modulação de contraste.

Figura 13: A: representação do estímulo de modulação de contraste nas três diferentes condições (0.0; 0.5; 1.0) para os LEDs verde e vermelho. B: representação da oponência cromática para cada modulação de contraste do estímulo. C: representação da luminância em cada condição de modulação de contraste.

Neste estudo o protocolo incluiu três modulações sinodais de contraste entre os LEDs verde e vermelho, que variaram conforme a fórmula;

$$R/(R+G)$$

Onde R é o contraste do LED vermelho e G é o contraste do LED verde. As três modulações foram 0.0, 0.5 e 1.0 de acordo com a fórmula acima. O LED verde variou em 100% de contraste e o LED vermelho permaneceu constante quando a modulação foi igual a 0.0. Ambos os LEDs variaram em 50% de contraste quando a modulação foi igual a 0.5. O LED vermelho variou em 100% e o LED verde permaneceu constante quando a modulação foi igual a 1.0. Essa modulação do contraste segue a lei de Michelson A luminância média desses estímulos foi de 100 cd/m² (figura 14)

Figura 14: Representação da modulação de contraste entre o LED vermelho (R) e o LED verde (G) em contra fase e com luminância média de 100 cd/m². Na figura A o LED verde variou em 100% de contraste e o LED vermelho permaneceu constante quando a modulação foi igual a 0.0 [$R/(R+G)=0.0$]. Na figura B ambos os LEDs variaram em 50% de contraste quando a modulação foi igual a 0.5 [$R/(R+G)=0.5$]. C; o LED vermelho variou em 100% e o LED verde permaneceu constante quando a modulação foi igual a 1.0 [$R/(R+G)=1.0$].

As três modulações foram apresentadas em 12 Hz (via de oponência cromática) e em 36 Hz (via de luminância). O número de apresentações do estímulo foi de no mínimo 40 para 12 Hz e 24 para 36 Hz, sendo que a resposta final foi a média dessas apresentações.

4.2.4 Processamento dos dados

Todos os pontos dos sinais foram processados por rotinas programadas no MATLAB (The MathWorks, Estados Unidos). Nos protocolos ON e OFF foi utilizada análise no domínio do tempo e assim obtidos os valores

de amplitude em microvolts (μV), e tempo implícito em milissegundos (ms) dos componentes negativos e positivos das respostas (figura 15).

Figura 15: Representa a medida da amplitude e tempo implícito da onda-a e onda-b no sinal ERG. As setas verticais representam a amplitude da onda-a (a) e da onda-b (b). As setas horizontais representam o tempo implícito da onda-a (L_a) e da onda-b (L_b).

Nos protocolos HFP foi aplicada análise Fourier pelo processamento no MATLAB. Foram utilizados o primeiro (fundamental) e o segundo harmônicos para gerar os valores de amplitude e fase. A relação sinal-ruído foi avaliada nas duas frequências temporais de acordo com a fórmula aplicada nos valores da amplitude:

$$F/[(F+1)+(F-1)/2]$$

Onde F é a fundamental, $(F+1)$ é o harmônico adjacente abaixo da fundamental e $(F-1)$, é o harmônico adjacente acima da fundamental. Quando o valor da relação sinal-ruído foi menor que 2, as fases correspondentes foram apagadas.

4.3 Avaliação Psicofísica

As avaliações psicofísicas foram aplicadas no mesmo olho da avaliação no ERG em todos os participantes dos três grupos e constaram de medidas de sensibilidade ao contraste para as vias visuais primárias paralelas ON (processamento de incremento de luz) e OFF (processamento de decremento de luz), e para sensibilidade ao contraste cromático verde/vermelho.

4.3.1 Equipamento

Os estímulos foram apresentados em monitor de vídeo (Triniton G420, Sony) programados na plataforma Delphi, utilizando uma placa gráfica VSG (Cambridge Research Systems, Reino Unido).

4.3.2 Procedimento

Os participantes foram posicionados a 1 m de distância do monitor de estímulo, numa sala escurecida. Foram instruídos a manter o olhar na cruz posicionada no centro do monitor durante toda a avaliação, piscar normalmente e avisar quando surgisse qualquer desconforto ou escurecimento da imagem, que pode acontecer devido à oclusão de um dos olhos. Em caso de algum desconforto o teste era parado para descanso do participante.

A tarefa era dizer verbalmente de que lado do monitor o estímulo aparecia a cada apresentação, dizendo direita (quando o estímulo aparecia no lado direito do monitor) ou esquerda (quando o estímulo aparecia

no lado esquerdo do monitor). No caso do participante não enxergar o estímulo em nenhum dos lados, o mesmo era instruído a escolher um dos lados. Os valores de limiar dos testes foram registrados pelo software e salvos no computador. Os testes psicofísicos foram aplicados, em média, por 20 minutos.

4.3.3 Protocolos

Foram aplicados três protocolos para avaliação psicofísica. Os protocolos usados foram:

ON: estímulo em forma de tabuleiro de xadrez de 4,5 graus de ângulo visual, com luminância média de 34,4 cd/m², contraste inicial de 10% que era modificado a cada apresentação do estímulo. Quando o participante acertava o lado em que o estímulo apareceu, o contraste diminuía utilizando o coeficiente 1,096. Quando o participante errava o lado em que o estímulo apareceu, era utilizado o coeficiente 1,122 para aumentar o contraste do estímulo. O estímulo foi apresentado 5 vezes em todas as tentativas. O contraste variou por multiplicador e a modulação da luminância, em forma de dente de serra. Como se trata de um estímulo ON a modulação de luminância aumentou abruptamente e diminuiu lentamente (figura 16).

Figura 16: Representação do estímulo psicofísico ON. As imagens acima (a, b, c e d) representam as fases do estímulo que modula a luminância durante sua apresentação na tela com fundo de luminância média de $34,4 \text{ cd/m}^2$. A imagem de baixo representa a modulação em dente de serra de cada fase acima, como é um estímulo ON a luminância aumenta abruptamente e diminui lentamente.

OFF: estímulo em xadrez de 4,5 graus de ângulo visual, luminância média de $34,4 \text{ cd/m}^2$, contraste inicial de 10%. O estímulo foi apresentado 5 vezes em todas as tentativas. O contraste variou por multiplicador, ou seja, quando o participante acertou o lado em que o estímulo apareceu o contraste diminuiu de acordo com o multiplicador 1,096; e quando o participante errou o lado em que o estímulo apareceu era utilizado o multiplicador 1,122 para aumentar o contraste do estímulo. O estímulo foi apresentado 5 vezes em todas as tentativas. O contraste variou por multiplicador e a modulação da luminância foi em dente de serra. Por ser um estímulo OFF a luminância diminuía abruptamente e aumentava lentamente (figura 17).

Figura 17: Representação do estímulo psicofísico OFF. As imagens acima (a, b, c e d) representam as fases do estímulo que modula a luminância durante sua apresentação na tela com fundo de luminância média de $34,4 \text{ cd/m}^2$. A imagem de baixo representa a modulação em dente de serra de cada fase acima, como é um estímulo OFF a luminância diminui abruptamente e aumenta lentamente.

Contraste cromático: estímulo em forma de tabuleiro de xadrez verde e vermelho isoluminante com 9 graus de ângulo visual. O contraste cromático inicial era 18% e a duração da apresentação do estímulo de 1000 ms. O contraste variou durante a aplicação do teste por multiplicadores. Quando o participante acertou a tarefa o contraste diminuiu conforme o coeficiente 0,95 e aumento de 1,1 quando o participante errou a tarefa. Para este protocolo o limiar do contraste cromático foi determinado pelo contraste entre as cores verde e vermelha. Antes de iniciar o teste de sensibilidade ao contraste cromático, foi aplicado um teste HFP (do inglês, *Heterochromatic Flicker Photometry*). O estímulo apresentado era semelhante ao estímulo utilizado para o teste de sensibilidade ao contraste cromático, entretanto, este possuía modulação temporal de 20 Hz. O sujeito era orientado a ajustar a luminância do verde e do vermelho de modo que o estímulo parecesse estático ou praticamente sem modulação temporal. Esse procedimento foi repetido 5 vezes e a os resultados médios foram inseridos como valores de luminância. O objetivo foi aferir a luminância do verde e do vermelho que varia entre os indivíduos. Esse procedimento foi realizado para cada participante.

O método para determinação do limiar foi o de escada simples, com o estímulo apresentado em todas as tentativas. Foi utilizado um total de 08

reversões para o término do experimento. O limiar de discriminação de contraste cromático foi determinado pela média aritmética das últimas reversões.

4.4 Análises estatísticas

A normalidade dos dados foi verificada com o teste Shapiro Wilk. Como os dados não possuíam distribuições normais foram comparados utilizando o teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis. Foram considerados estatisticamente significantes valores de $p < 0,05$.

5. Resultados

Os resultados eletrorretinográficos e psicofísicos estão descritos abaixo, como já mencionado na metodologia os grupos foram divididos em três: controle, DMD e DM1. No grupo DMD apenas cinco participantes eram do subgrupo upstream, sendo que apenas dois realizaram os testes eletrorretinográficos e por isso o resultado descrito do grupo DMD é composto apenas por participantes downstream.

5.1 Eletrorretinográficos – ERG

5.1.1 Mesópico

Foram testadas as vias ON e OFF na condição mesópica dos três grupos. A figura 18 representa os sinais mesópico ON e OFF de um participante de cada grupo: controle, DMD e DM1.

Figura 18: Sinal de um indivíduo de cada grupo: controle, DMD e DM1. A figura da esquerda é o sinal individual da condição mesópica ON e a figura da direita é o sinal individual da condição mesópica OFF.

Os resultados do protocolo mesópico ON mostram alteração para os pacientes com DMD e DM1 em relação ao controle. A onda-a apresenta alterações tanto na amplitude quanto no tempo implícito. A amplitude da onda-a ($H=6,64$; $p=0,036$) é menor no DMD em relação ao controle e maior no grupo DM1 em relação ao grupo controle. O tempo implícito da onda-a ($H=7,74$; $p=0,02$) é maior em DMD em relação ao controle e DM1 (figura 19). Já a onda-b não apresenta diferença significativa no tempo implícito, Mas a amplitude da onda-b ($H= 12,41$; $p=0,002$) é menor em DMD em relação ao controle e maior em DM1 em relação ao controle (figura 20). Os valores da mediana e quartis do mesópico ON estão na tabela 4.

Figura 19: Gráfico dos resultados mesópico ON onda-a para os três grupos: controle (1), DMD (2) e DM1(3). A: Amplitude da onda-a, o asterisco sinaliza o grupo com estatística significativa. B: Tempo implícito da onda-a, o asterisco sinaliza o grupo com estatística significativa.

Figura 20: Gráfico dos resultados da amplitude da onda-b do mesópico ON nos três grupos: controle (1), DMD (2) e DM1(3). O asterisco sinaliza os resultados estatisticamente significantes.

Tabela 4: Descrição dos valores da mediana (1º quartil; 3ºquartil) das amplitudes e tempos implícitos da onda-a e onda-b do resultado mesópico ON no controle, DMD e DM1. Foram considerados significantes os valores de $p < 0,05$.

Mesópico ON				
	Onda-a		Onda-b	
	Amplitude (µV)	Tempo (ms)	Amplitude (µV)	Tempo (ms)
Controle	16,9 (11,4;20,6)	31,1 (31,2; 32,2)	51,2 (33,1; 75,3)	67,4 (62,5; 71,2)
DMD	9,6 (5,0; 12,8) p=0,03	35,2 (10,7; 36,1) p=0,02	19,3 (9,2; 37,4) p=0,002	77,1 (64,4;139,6)
DM1	23,8 (15,8; 28,1) p=0,03	34,2 (32,2; 35,1)	64,1 (56,8; 98,1) p=0,002	72,3 (66,4;78,1)

O resultado mesópico OFF mostra alteração de amplitude e tempo implícito do pico negativo. A amplitude ($H=16,03$; $p < 0,001$) é menor para o grupo DMD em relação ao controle e maior para o grupo DM1 em relação ao controle. O tempo implícito ($H=9,63$; $p=0,008$) do pico negativo é menor no DMD em relação ao controle e maior para o grupo DM1 em relação ao controle (figura 21). O pico positivo do mesópico OFF apresenta alteração apenas na amplitude, sem diferença significativa do tempo implícito entre os grupos. A

amplitude do pico positivo ($H=7,91$; $p=0,010$) é reduzido para DMD em relação ao grupo controle e DM1 maior em relação ao controle (figura 22).

Os valores da mediana e quartis do resultado mesópico OFF estão juntamente com os valores de significância estatística na tabela 5.

Figura 21: Gráfico dos resultados mesópico OFF onda-a para os três grupos: controle, DMD e DM1. A: Amplitude da onda-a, o asterisco sinaliza o grupo com estatística significativa. B: Tempo implícito da onda-a, o asterisco sinaliza o grupo com estatística significativa.

Figura 22: Gráfico dos resultados da amplitude da onda-b do mesópico OFF nos três grupos: controle, DMD e DM1. O asterisco sinaliza os resultados estatisticamente significantes.

Tabela 5: Descrição dos valores da mediana (1º quartil; 3ºquartil) das amplitudes e tempos implícitos da onda-a e onda-b do resultado mesópico OFF, nos três grupos. Os valores de p significativos estão em **negrito** ($p < 0,05$).

Mesópico OFF				
	Pico negativo		Pico positivo	
	Amplitude (µV)	Tempo (ms)	Amplitude (µV)	Tempo (ms)
Controle	26,0 (18,8; 36,7)	89,3 (82,0; 101,6)	39,6 (28,6; 57,0)	180,2 (175,8; 185,5)
DMD	4,0 (1,1; 7,8) p<0,001	22,5 (6,8; 56,6) p=0,008	20,8 (13,5; 34,3) p=0,01	192,4 (162,1; 193,3)
DM1	31,8 (18,7; 62,3) p<0,001	101,6 (91,8; 104,5) p=0,008	42,0 (26,4; 99,5) p=0,01	182,6 (172,8; 193,4)

5.1.2 Fotópico

Na condição fotópica foram testadas as vias ON e OFF na dos três grupos. A figura 23 ilustra os sinais mesópico ON e OFF de um participante de cada grupo: controle, DMD e DM1.

Figura 23: Ilustração do sinal de um indivíduo de cada grupo: controle, DMD e DM1. A figura da esquerda é o sinal individual da condição fotópica ON e a figura da direita é o sinal individual da condição fotópica OFF.

O resultado fotópico apresenta diferença entre os grupos apenas na via ON, a via OFF não apresenta diferença significativa. Na onda-a do fotópico ON o tempo implícito ($H=8,95$; $p=0,01$) é maior no grupo DMD em relação controle e DM1 (figura 24). A onda-b apresenta diferença significativa para o tempo implícito e amplitude. O tempo implícito da onda-b ($H=8,68$; $p=0,01$) o grupo DMD tem maior tempo em relação ao controle. Já na amplitude da onda-b ($H=12,8$; $p<0,001$) o grupo DMD é reduzido em relação ao grupo controle e DM1 (figura 25). Os valores dos resultados fotópicos ON e OFF estão nas tabelas 6 e 7.

Figura 24: Gráfico dos resultados do tempo implícito da onda-a do fotópico ON nos três grupos: controle, DMD e DM1. O asterisco sinaliza os resultados estatisticamente significantes.

Figura 25: Gráfico dos resultados fotópico ON onda-b para os três grupos: controle, DMD e DM1. A: Tempo implícito da onda-a, o asterisco sinaliza o grupo com estatística significativa. B: Amplitude da onda-a, o asterisco sinaliza o grupo com estatística significativa.

Tabela 6: Descrição dos valores da mediana (1º quartil; 3ºquartil) das amplitudes e tempos implícitos da onda-a e onda-b do fotópico ON, nos três grupos.

Fotópico ON				
	Onda-a		Onda-b	
	Amplitude (μV)	Tempo (ms)	Amplitude (μV)	Tempo (ms)
Controle	45,9 (36,7; 68,2)	23,4 (22,5; 24,4)	80,2 (68,1; 117,4)	41,0 (40,0; 41,0)
DMD	42,3 (32,3; 63,4)	25,39 (23,4; 25,4) p=0,01	34,7 (31,4; 52,1) p<0,001	42,0 (42,0; 43,0) p=0,01
DM1	51,5 (45,1; 79,4)	22,5 (22,4; 23,4)	88,4 (68,8; 101,9)	41,0 (40,0; 42,0)

Tabela 7: Descrição dos valores da mediana (1º quartil; 3ºquartil) da amplitude e tempo implícito da onda-d do resultado fotópico OFF, nos três grupos.

Fotópico OFF		
	Onda-a	
	Amplitude (μV)	Tempo (ms)
Controle	43,7 (32,8; 78,5)	21,5 (20,5; 22,4)
DMD	44,3 (31,0; 57,7)	21,5 (20,5; 22,5)
DM1	57,9 (46,8; 69,6)	21,5 (20,5; 22,5)

5.1.3 *Flicker* Heterocromático

As figuras 26 e 27 são ilustração dos valores da resposta de um indivíduo de cada grupo para o eletrorretinograma de *Flicker* heterocromático. A figura 26 mostra o sinal na frequência temporal de 12 Hz nas três condições de modulação de contraste: 0.0, 0.5 e 1.0. A figura 27 é a ilustração das três condições de modulação de contraste na frequência temporal de 36 Hz.

Figura 26: Ilustração do sinal de um indivíduo de cada grupo: controle, DMD e DM1. A ilustração à esquerda é o sinal individual da condição 0.0, a ilustração central é o sinal na condição 0.5 e a ilustração à direita o sinal na condição 1.0, em 12 Hz.

Figura 27: Ilustração do sinal de um indivíduo de cada grupo: controle, DMD e DM1. A ilustração à esquerda é o sinal individual da condição 0.0, a ilustração central é o sinal na condição 0.5 e a ilustração à direita o sinal na condição 1.0, em 12 Hz.

Na figura 28 os resultados dos grupos DMD, DM1 e controle para o estímulo HFP em 12 Hz (via cromática), 1º harmônico. O gráfico abaixo representa a amplitude dos três grupos nas três condições de variação de contraste. Os valores estatisticamente significantes estão marcados com asterisco. Na amplitude do 1º harmônico há diferença nas condições 0.5 ($H=10,4$; $p=0,006$) e 1.0 ($H=8,9$; $p=0,011$) para o grupo DMD em relação ao controle e DM1. O grupo controle e DM1 tiveram respostas semelhantes. A resposta do grupo DMD é semelhante à resposta de 36 Hz (via de luminância) com redução da amplitude na condição 0.5 em relação às condições 0.0 e 1.0.

A fase do primeiro harmônico também é diferente para o grupo DMD e DM1 em relação ao grupo controle na condição 0.5 ($H=15$; $p=0,001$) e na condição 1.0 ($H=12,3$; $p=0,002$). A tabela 8 apresenta os valores de mediana e quartis das condições 0.0, 0.5 e 1.0 nos três grupos para a frequência temporal de 12 Hz.

Figura 28: Gráfico dos resultados da amplitude e fase do 1º harmônico para o estímulo HFP em 12 Hz (via cromática). Os três grupos: controle (—◆—), DMD (—■—) e DM1 (—▲—) são representados no gráfico acima com valores da mediana da amplitude nas três condições de modulação do estímulo e no gráfico abaixo os valores da mediana da fase nas três condições de modulação do estímulo HFP: 0.0, 0.5 e 1.0.

Tabela 8: Mediana e quartis da amplitude e fase do primeiro harmônico do estímulo HFP em 12 Hz para os grupos controle, DMD e DM1.

HFP-12 Hz 1º harmônico	Amplitude (µV) – 0.0	Fase (graus)- 0.0	Amplitud e (µV) -0.5	Fase (graus)- 0.5	Amplitude (µV) – 1.0	Fase (graus)- 1.0
Controle	2,5 (1,7; 4,2)	299 (261; 335)	3,7 (3,0; 5,5)	327 (322; 338)	4,7 (3,2; 6,8)	300 (293; 320)
DMD	4,8 (2,7; 6,6)	291 (280; 301)	1,8 (1,3; 2,4) p=0,006	297 (253; 317) p=0,001	8,0 (6,6; 11,0) p=0,011	263 (246; 267) p=0,002
DM1	2,6 (2,0; 3,8)	310 (269; 350)	4,0 (3,3; 5,5)	295 (275; 325) p=0,001	5,3 (4,8; 7,5)	276 (246; 317) p=0,002

A análise estatística não mostra diferença significativa para amplitude em todas as condições do 2º harmônico em 12 Hz entre os grupos. Apenas na fase do 2º harmônico na condição 0.0 há diferença entre DMD e DM1 em relação ao controle ($H=17,5$; $p=0,002$). A figura 29 apresenta os valores de mediana na amplitude e fase do 2º harmônico de 12 Hz. Na tabela 9 os valores de mediana e quartis em todas as condições do 2º harmônico.

Figura 29: Gráfico dos resultados da amplitude e fase do 2º harmônico para o estímulo HFP em 12 Hz (via cromática). Os três grupos: controle (—◆—), DMD (—■—) e DM1 (—▲—) são representados no gráfico acima os valores da mediana da amplitude nas três condições de modulação do estímulo e no gráfico abaixo os valores da mediana da fase nas três condições de modulação do estímulo HFP: 0.0, 0.5 e 1.0.

Tabela 9: Mediana e quartis da amplitude e fase do segundo harmônico do estímulo HFP em 12 Hz para os grupos controle, DMD e DM1. Os valores estatisticamente significantes ($p < 0,05$) estão em negrito.

HFP-12 Hz 2º harmônico	Amplitude (µV) – 0.0	Fase (graus)- 0.0	Amplitude (µV) - 0.5	Fase (graus)- 0.5	Amplitude (µV) – 1.0	Fase (graus)- 1.0
Controles	1,6 (0,8; 2,7)	136 (112; 194)	1,4 (0,9; 2,0)	323 (283; 334)	5,3 (3,5; 6,5)	287 (281; 308)
DMD	3,1 (1,7; 3,8)	275 (260; 293) p=0,002	0,6 (0,4; 1,0)	304 (287; 322)	4,1 (3,3; 5,6)	298 (281; 326)
DM1	1,9 (1,2; 3,4)	273 (263; 330) p=0,002	1,4 (1,0; 2,5)	255 (242; 341)	4,9 (3,4; 6,6)	313 (295; 342)

As respostas da amplitude do estímulo HFP em 36 Hz não apresentam diferença entre os grupos. Na fase há diferença entre o grupo controle, DMD e DM1 para as três modulações de estímulo: 0.0 ($H=12,2$; $p=0,002$), 0.5 ($H=8,09$; $p=0,01$) e 1.0 ($H=24,7$; $p<0,001$) (figura 30R). Os valores das medianas e quartis do 1º harmônico em 36 Hz estão na tabela 10.

Figura 30: Gráfico dos resultados da amplitude e fase do 1º harmônico para o estímulo HFP em 36 Hz (via de luminância). Os três grupos: controle (—♦—), DMD (—■—) e DM1 (—▲—) são representados no gráfico acima com valores da mediana da amplitude nas três condições de modulação do estímulo e no gráfico abaixo os valores da mediana da fase nas três condições de modulação do estímulo HFP: 0.0, 0.5 e 1.0.

Tabela 10: Média e desvio padrão da amplitude e fase do primeiro harmônico do estímulo HFP em 36 Hz para os grupos controle, DMD e DM1. Os valores estatisticamente significantes ($p < 0,05$) estão em negrito.

HFP-36 Hz 1° harmônico	Amplitude (μV) – 0.0	Fase (graus)- 0.0	Amplitude (μV) -0.5	Fase (graus)- 0.5	Amplitude (μV) – 1.0	Fase (graus)- 1.0
Controle	11,5 (8,8; 16,2)	323 (314; 326)	3,0 (2,2; 5,1)	139 (127; 152)	21,1 (15,5; 28,0)	135 (118; 143)
DMD	11,8 (9,2; 16,8)	301 (293; 313) p=0,002	3,8 (1,0; 4,8)	112 (87; 130) p=0,01	17,9 (14,4; 21,0)	110 (87; 131) p<0,001
DM1	9,8 (5,4; 17,1)	298 (191; 320) p=0,002	1,3 (0,9; 3,8)	154 (130; 336) p=0,01	14,4 (8,0; 27,2)	260 (235; 343) p<0,001

Os resultados para os três grupos no 2º harmônico de 36 Hz apresenta característica de via de luminância (1º harmônico). A amplitude é reduzida na condição 0.5 para o grupo DM1 ($H=7,08$; $p=0,02$). Os valores da fase foram similares para os três grupos, com diferença apenas na condição 0.5 entre DM1 e o grupo controle e DMD ($H=8,8$; $p=0,001$) (figura 31). Os valores de mediana e quartis da amplitude e fase para o 2º harmônico do estímulo HFP em 36 Hz estão na tabela 11.

Figura 31: Gráfico dos resultados da amplitude e fase do 2º harmônico para o estímulo HFP em 36 Hz (via de luminância). Os três grupos: controle (—◆—), DMD (—■—) e DM1 (—▲—) são representados no gráfico acima os valores da mediana da amplitude nas três condições de modulação do estímulo e no gráfico abaixo os valores da mediana da fase nas três condições de modulação do estímulo HFP: 0.0, 0.5 e 1.0.

Tabela 11: Média e desvio padrão da amplitude e fase do segundo harmônico do estímulo HFP em 36 Hz para os grupos controle, DMD e DM1. Os valores estatisticamente significantes ($p < 0,05$) estão em negrito.

HFP-36 Hz 2º harmônico	Amplitude (µV) – 0.0	Fase (graus)- 0.0	Amplitude (µV) -0.5	Fase (graus)- 0.5	Amplitude (µV) – 1.0	Fase (graus)- 1.0
Controles	1,9 (1,3; 3,5)	315 (301; 331)	0,8 (0,6; 1,3)	192 (178; 218)	3,5 (2,2; 5,1)	283 (264; 302)
DMD	2,0 (1,0; 2,7)	327 (277; 333)	0,9 (0,5; 1,2)	193 (111; 145)	1,7 (1,5; 3,0)	221 (183; 328)
DM1	1,6 (0,8; 3,7)	296 (240; 313)	0,3 (0,2; 0,7) p=0,02	249 (204; 293) p=0,001	2,0 (0,6; 3,9)	261 (216; 294)

5.2 Psicofísicos

Os resultados psicofísicos estão apresentados nas tabelas 32, 33 e 34 com os valores das medianas e quartis para os três grupos. Na análise estatística não há diferença entre os grupos. As tabelas 12, 13 e 14 representam os valores de mediana para cada teste psicofísico nos três grupos testados. O grupo DMD está representado apenas pelos participantes downstream, como nos resultados eletroretinográficos.

Figura 32: Gráfico com os valores de sensibilidade em mediana para os testes: contraste cromático. OS três grupos são representado no eixo x: controle (1), DMD (2) e DM1 (3).

Tabela 12: Descrição dos valores da mediana (1º quartil; 3ºquartil) da sensibilidade ao contraste cromático verde/vermelho para os três grupos: controle, DMD e DM1.

Sensibilidade	Mediana	Quartil (1º; 3º)
Controle	0,6	0,5; 0,8
DMD	0,5	0,4; 0,6
DM1	0,6	0,5; 0,8

Figura 33: Gráfico com os valores de sensibilidade em mediana para o teste ON. OS três grupos são representado no eixo x: controle (1), DMD (2) e DM1 (3).

Tabela 13: Descrição dos valores da mediana (1º quartil; 3ºquartil) da sensibilidade ao teste ON para os três grupos: controle, DMD e DM1.

Sensibilidade	Mediana	Quartil (1º; 3º)
Controle	1,1	0,8; 1,3
DMD	0,7	0,5; 1,1
DM1	0,8	0,5; 1,1

Figura 34: Gráfico apresenta valores de sensibilidade em mediana para o teste OFF. OS três grupos são representado no eixo x: controle (1), DMD (2) e DM1 (3).

Tabela 14: Descrição dos valores da mediana (1º quartil; 3ºquartil) da sensibilidade ao teste OFF para os três grupos: controle, DMD e DM1.

Sensibilidade	Mediana	Quartil (1º; 3º)
Controle	1,0	0,8; 1,1
DMD	0,9	0,7; 1,0
DM1	0,9	0,6; 1,3

6 Discussão

Os resultados mostram que a Distrofia muscular de Duchenne e a Diabetes Mellitus tipo 1 afetam diferentemente o processamento visual. Essas alterações foram identificadas através do estudo de sinais eletrorretinográficos iniciados pela ativação preferencial das vias visuais ON e OFF e das vias visuais de luminância e de otonância cromática. Embora a diferença fosse esperada, considerando os diferentes mecanismos fisiopatológicos das doenças, o presente estudo é pioneiro em mostrar sinais eletrofisiológicos isolados da via de luminância e de otonância cromática da retina com estímulo de *flicker* heterocromático e, portanto, é possível identificar de forma detalhada os mecanismos visuais envolvidos em cada doença.

A DMD altera a comunicação sináptica entre fotorreceptor e células bipolares da retina (D'Souza et al., 1995; Satz & Campbell, 2008) e as alterações retinianas da DM1 é resultado da alteração da camada interna da retina com morte de células desta camada (van Dijk et al., 2010, Du et al., 2013). A DMD está associada à alteração na amplitude e no tempo implícito da resposta para estímulos que ativam preferencialmente as vias visuais ON e OFF, em condições mesópica e fotópica. O presente trabalho confirma que na condição fotópica apenas as respostas da via ON estão alteradas (Barboni et al., 2013). Além disso, há alteração nas respostas da via visual ativada por estímulos heterocromáticos com frequência temporal de 12 Hz e na fase da via visual ativada por estímulos heterocromáticos com frequência temporal de 36 Hz. Por um lado, sabe-se que essa alteração no processamento heterocromático está relacionada ao desequilíbrio dos mecanismos ON e OFF iniciados pelos cones (Barboni et al., 2016). Entretanto, não se sabe se essas alterações ocorrem devido ao componente heterocromático do estímulo, se é determinada pela frequência da estimulação temporal, ou ambos os aspectos da estimulação estariam envolvidos nas alterações.

A DM1 está associada às alterações na amplitude de respostas de ambos os mecanismos ON e OFF quando há estimulação mesópica e na fase das respostas aos estímulos heterocromáticos independente da frequência de estimulação. Considerando que não houve alteração na condição fotópica para estimulação ON e OFF, podemos concluir que alterações na fase das respostas para estímulos heterocromáticos encontrados em pacientes DM1 não estão relacionadas ao desequilíbrio ON/OFF da via dos cones que é identificado no grupo DMD. Mas estes dados sugerem que a retina externa está afetada, além da retina interna.

6.1 DMD

Pacientes com DMD apresentam a onda-b do ERG de campo total escotópico reduzida (Fitzgerald; Cibis, Ricotti et al., 2016). Além disso, estímulos com modulação da luminância em dente de serra nas condições mesópica e fotópica resultam em respostas eletrofisiológicas alteradas no modelo experimental da DMD (*mdxCv3*; Tsai et al., 2016) e em pacientes com DMD (Barboni et al., 2013). Além da redução da onda-b, lentificação das respostas nas condições fotópica e mesópica estão relacionadas com a alteração no gene *dmd* (Tsai et al., 2016; Ricotti et al., 2016). Em resumo, a literatura mostrou que estímulos escotópicos, mesópicos e fotópicos são capazes de identificar alterações na retina relacionadas com a ausência da distrofina (Cibis et al., 1993, Fitzgerald et al., 1994, Barboni et al., 2013; Tsai et al., 2016).

A alteração na via ON é esperada na alteração do gene *dmd*, devido sua relação com a comunicação entre fotorreceptor e células bipolar do tipo ON. A célula bipolar ON conecta-se na invaginação do terminal sináptico do fotorreceptor, região onde está localizada a proteína Dp260 (Schmitz & Drenckhanhn 1997, Vardi et al., 1998; Morigiwa & Vardi 1999, Vardi et al., 2002), enquanto as células bipolares do tipo OFF fazem conexão com os fotorreceptores na base do terminal sináptico (Schmitz & Drenckhanhn 1997).

Essa organização sináptica poderia explicar o prejuízo na atividade da via visual ON da retina quando há alteração genética que afeta a expressão da Dp260.

As alterações na atividade da via visual OFF da retina em condição mesópica (cones e bastonetes em atividade), (Barboni et al., 2013, Tsai et al., 2016, Ricotti et al., 2016; presente estudo) confirmam a hipótese da alteração na sinapse está relacionada com as conexões que ocorrem na invaginação do terminal sináptico dos fotorreceptores, pois os bastonetes enviam seus sinais OFF para a retina interna principalmente através das células bipolares do tipo ON que fazem contato na invaginação do seu terminal sináptico. Diferente do que ocorre com os cones que as vias de processamento ON e OFF funcionam separadamente e os contatos sinápticos ON (parte invaginada do terminal sináptico) e OFF (parte plana do terminal sináptico) ocorrem em locais distintos. Quando a estimulação é exclusivamente dos cones (condição fotópica) o mecanismo OFF da retina encontra-se poupado. Portanto pode-se concluir que a alteração nas respostas geradas pela estimulação mesópica que ativa preferencialmente a via visual OFF está relacionada à via dos bastonetes cujo processamento (conforme descrito anteriormente) depende da ativação inicial da célula bipolar do tipo ON e cujo contato sináptico ocorre no interior da invaginação (Bloomfield & Dacheux, 2001, Zaghoul, Boahen, & Demb, 2003, Wässle, 2004).

Além da alteração nas vias ON e OFF os pacientes com DMD apresentam alteração das respostas para estímulos em *flicker* heterocromático principalmente na amplitude em 12 Hz e na fase do primeiro harmônico em 36 Hz. Está é a primeira vez que este protocolo é aplicado em pacientes com DMD. As respostas para os estímulos heterocromáticos em 12 Hz estão alteradas no grupo DMD, tanto em amplitude quanto em fase. Sujeitos saudáveis apresentam diferença nas respostas para estímulos heterocromáticos em 12 Hz e 36 Hz. Em 12 Hz a amplitude e fase são relativamente constantes, independentemente do contraste (100%, 50% ou 0%) da luz verde e da luz vermelho que são apresentadas com diferença de

fase de 180°. Em 36 Hz amplitude e fase são dependentes do contraste do verde e do vermelho. A amplitude de resposta é menor quando não há diferença de contraste, e a fase da resposta é aproximadamente 180° diferente (Kremers et al., Barboni et al., 2013, Martins et al., 2016; Jacob et al., 2015).

Alterações no gene *dmd* modificam a atividade da via cromática (oponência verde-vermelho) da retina ativada por estímulos heterocromáticos com modulação senoidal e frequência temporal de 12 Hz. Amplitude e fase, que em sujeitos saudáveis são relativamente constantes, em pacientes com DMD mudam dependendo do contraste do verde e do vermelho, por isso nas condições extremas de contraste (0.0 e 1.0) a amplitude é alta e na condição 0.5 que o contraste é mínimo a amplitude é baixa. Este resultado pode ser consequência da relação entre contraste de luminância e frequência temporal, pois nos estímulos de alto contraste de luminância a amplitude é alta e para baixo contraste, a amplitude é reduzida (Odom, Reits, Burgers, & Riemslag, 1992, Pangen, Horn, & Kremers, 2010).

Outra questão que influencia este resultado é o fato da via ON estar alterada, isso muda a interação entre vias ON e OFF. Em condições normais nos estímulos senoidais há contraposição de componentes ON e OFF, ou seja a resposta ao estímulo senoidal muda no caso da via ON estar afetada. O aumento da amplitude na resposta ao estímulo senoidal é observado com o bloqueio da via ON (Kondo & Sieving, 2002). Além disso, as respostas das vias ON e OFF na frequência de 12 Hz apresentam a mesma amplitude, mas com 180° de diferença em fase para indivíduos em condições normais (Odom et al., 1992, Kondo & Sieving, 2001). No grupo controle as respostas ON e OFF podem ter cancelado uma a outra e por isso a amplitude reduzida em relação ao DMD. A distrofina parece perturbar a sincronização dos sinais vermelho e verde do mecanismo de oponência cromática na resposta da retina humana. A evidência da assimetria, o defeito das respostas ON do ERG em pacientes com DMD reforça a hipótese de que o aumento das amplitudes em 12 Hz nas condições $R/(R+G)= 0.0$ e $R/(R+G)= 1.0$ são resultados desta mudança de fase que não cancelaria vermelho e verde. O efeito da assimetria das vias visuais ON e OFF dos cones na atividade da via que processa sinais heterocromáticos (verde-

vermelho) em 12 Hz foi recentemente publicado por nosso grupo (Barboni et al., 2016) e podem explicar, ao menos em parte, o prejuízo na visão de cores de pacientes com DMD que apresentam alteração específica para o eixo verde-vermelho de discriminação cromática (Costa et al., 2007).

Apesar dos achados recentes de alteração na função de sensibilidade ao contraste de luminância e cromático verde-vermelho em pacientes com DMD (Costa et al., 2011), na presente pesquisa o teste psicofísico para avaliação da sensibilidade ao contraste cromático verde-vermelho para frequência espacial de 0,5 ciclos por grau (cpg) é semelhante para pacientes com DMD e controles. A diferença nos resultados pode estar relacionada com o método aplicado para a avaliação da sensibilidade ao contraste.

O estímulo visual nesta pesquisa é em forma de tabuleiro de xadrez verde-vermelho com 0.5 cpg, a tarefa de escolha forçada, com 10 segundos de apresentação do estímulo e 8 reversões para determinação do limiar, diferente disso, Costa e colaboradores (2011) avalia a sensibilidade ao contraste cromático com estímulo de grades senoidais em 6 frequências espaciais diferentes (0,2; 0,3; 0,5; 0,7; 1,2 e 2,0 cpg) e utiliza o método de ajuste para determinar o limiar. Os testes psicofísicos que tem por objetivo ativar preferencialmente a via visual ON e a via visual OFF também foram semelhantes entre os dois grupos: pacientes com DMD e controles. No trabalho de Barboni e colaboradores (2013), a sensibilidade ao contraste para incremento de luminância examinada através de teste psicofísico com o objetivo de avaliar a integridade via visual ON mostra alteração em pacientes com DMD, é utilizado luminância média de 56, 7cd/m², o método de escolha forçada em duas frequências espaciais 0,3 e 2,0 cpg, com diferentes tempo de apresentação 33 ms e 1500 ms, respectivamente. O presente estudo optou por um método mais rápido devido ao tempo dos testes para que os pacientes de DMD não ficassem cansados durante a aplicação, já que todos os testes eram realizados no mesmo dia. A escolha pela redução do tempo de aplicação pode ter influenciado nos resultados.

6.2 DM tipo 1

No presente estudo os resultados eletrofisiológicos dos pacientes com DM1 foram diferentes dos resultados dos controles. Respostas geradas por estímulos que ativam preferencialmente ambas as vias visuais ON e OFF na condição mesópica (contribuição de cones e bastonetes) estão alteradas em pacientes DM1. Por outro lado, na condição fotópica (contribuição exclusiva dos cones) as respostas para estimulação preferencial de ambas as vias ON e OFF foram semelhantes entre pacientes DM1 e controles.

Os resultados sugerem que a alteração na atividade retiniana de pacientes DM1 sem retinopatia diabética está relacionada aos mecanismos que dependem da ativação dos bastonetes e não aos mecanismos que dependem da ativação dos cones. Curiosamente, a alteração em ambas as vias visuais ON e OFF na condição mesópica em pacientes com DM1 está relacionada ao aumento da amplitude de resposta, além do aumento no tempo implícito. O trabalho de Yu e colaboradores (2013) mostra hiperatividade das células ganglionares do tipo ON em modelo animal de diabetes tipo 1 e sugere que esta alteração pode ser consequência de redução de mecanismos inibitórios. Lung e colaboradores (2016) mostram aumento na amplitude do componente ON em pacientes diabéticos tipo 2 no ERG multifocal, sugerindo que um estágio precoce da retinopatia diabética levaria ao aumento da atividade celular na retina com a mudança ou redução da interação das vias ON e OFF. No entanto os dados deste trabalho não mostram desequilíbrio entre via ON e OFF em pacientes DM tipo 1. Outro fenômeno que poderia explicar os resultados obtidos é que o aumento na amplitude de sinais eletrofisiológicos da retina pode decorrer devido à liberação de fatores neurotróficos em resposta a apoptose das células ganglionares na camada interna da retina.

Apesar de a literatura mostrar que estes fatores estão reduzidos na retina de pacientes diabéticos devido ao desequilíbrio entre apoptose e fatores de regeneração (Barber et al., 1998, Araszkievicz & Ziolkiewicz, 2016), já se sabe que a insulina auxilia o funcionamento dos fatores neurotróficos reduzindo a apoptose das células na camada interna da retina em modelo animal de diabetes (Kermer, Klöcker, Labes, & Bähr, 2000, Whitmire, Al-Gayyar, Abdeldaid, Yousufzai, & El- Remessy, 2011). No presente estudo, a média de uso da insulina é de 6,5 ($\pm$ 3,6) anos no grupo DM1, o que pode ter colaborado para a diminuição da apoptose de células ganglionares. Além disso, o trabalho de Gastinger e colaboradores (2008) mostra que apesar da morte de células ganglionares em modelo animal de diabetes, há mudanças morfológicas de células ganglionares do tipo ON como aumento da arborização dendrítica e do tamanho do corpo celular, como resposta compensatória em relação à morte celular de outros tipos de ganglionares. Tanto o aumento na amplitude quanto o aumento do tempo implícito na condição mesópica mostram alterações no nível da via de bastonetes antes da alteração vascular, uma vez que os exames de angiofluoresceinografia não mostram presença de retinopatia diabética.

Com relação à ausência de alteração nas condições fotópica ON e OFF em pacientes com DM1, Holipgian e colaboradores (1992) encontraram resultados normais para a onda-a e onda-b na estimulação fotópica em pacientes diabéticos do tipo 1 e do tipo 2. Além disso, Lovasik e Spafford (1988) relatam diferença no teste de potenciais oscilatórios fotópicos entre pacientes com DM tipo 1 (insulino-dependentes). Uma hipótese para a integridade da resposta à estimulação fotópica é que na fase inicial da doença há um acometimento de bastonetes como observado no modelo animal de DM1 (Phipps, Fletcher, & Vingrys, 2004, Phipps, Yee, Fletcher, & Vingrys, 2006). Portanto, a avaliação da via ON e OFF na condição mesópica pode ser mais sensível para detecção precoce de repercussões na retina ocasionadas pela DM.

Por outro lado, alguns estudos utilizando apenas a estimulação fotópica no ERG multifocal mostram aumento do tempo implícito em diabéticos sem RD (Kurtenbach, Langrova, & Zrenner, 2000, Bearse et al., 2006). No entanto os estudos não realizaram avaliação da condição mesópica, não podendo afirmar se a mesma poderia também estar alterada. Enquanto o trabalho de Gualtieri e colaboradores (2013), utilizando ERG de campo total mostra alteração em diferentes condições de luminância, como redução da amplitude e aumento da latência dos Potenciais Oscilatórios e aumento da latência de resposta dos bastonetes em pacientes DM tipo 2 sem alterações oftalmológicas, segundo a avaliação clínica. É possível que as alterações encontradas somente na condição mesópica realizada nos pacientes com DM1 deste estudo esteja relacionada com melhor controle clínico dos mesmos, evitando assim progressão da doença e danos em outras estruturas da retina.

Em relação às respostas retinianas de estimulação da via cromática e de luminância, para ambas as vias o grupo DM1 apresentou alteração na fase de respostas, tanto no 1º harmônico quanto no 2º harmônico. O 1º harmônico do estímulo de flicker senoidal está relacionado com atividade da camada externa (Odom, Kondo e Sieving 2002). O 2º harmônico provavelmente reflete atividades da camada interna da retina (Odom et al., 19991, Viswanathan, Frishman, & Robson, 2002), mas também é provável que sofra influências pós receptorais de interação das vias ON e OFF (Kondo e Sieving 2002). Assim o resultado do flicker heterocromático dos pacientes de DM1 mostra dano na atividade da camada interna e camada externa da retina. Esta é a primeira vez que o protocolo de ERG com estimulação por *flicker* heterocromático (verde-vermelho) é aplicado em pacientes com DM1. Ghirlanda e colaboradores (1991) usaram estímulo de flicker ERG (luminância) em pacientes insulino dependentes sem retinopatia e o resultado mostra que há alterações apenas no 2º harmônico, sugerindo que a disfunção da retina em pacientes insulino dependentes sem retinopatia é na camada interna.

O flicker heterocromático já foi utilizado para avaliar pacientes com glaucoma, uma doença que também acomete as células ganglionares

localizadas na retina interna. Pacientes com glaucoma com prejuízos no campo visual apresentam as fases das respostas para a estimulação de ambas a via cromática e de luminância alteradas, enquanto pacientes com glaucoma sem prejuízos de campo visual apresentam alteração nas fases de respostas para o protocolo que estimula preferencialmente a via de luminância (36 Hz). O estudo relata que a fase alterada nas duas vias em pacientes com defeito de campo visual no glaucoma é provavelmente defeito pós-receptoral (Barboni et al., 2011). Com isso a alteração da fase na via cromática e na via de luminância de pacientes com DM1 sugere dano nas camadas interna e externa da retina antes da alteração vascular. Além disso, na DM 1 a medida da fase é mais sensível para detectar alterações de retina do que a amplitude.

Na avaliação de sensibilidade ao contraste cromático, não é encontrada diferença estatisticamente significativa entre o grupo DM1 e o grupo controle neste estudo. Entretanto, a literatura tem mostrado que a avaliação da visão de cores encontra-se comprometida em diferentes estágios da diabetes. Hardy e colaboradores (1992) mostra que em pacientes DM1 sem retinopatia diabética têm alteração no teste de visão de cores utilizando o teste Farnsworth-Munsell 100-hue. Garcia (2012) também mostra resultado semelhante, utilizando metodologia diferente, o Cambridge Colour Test (CCT) para o protocolo Trivector, onde o estímulo apresentado diferença do fundo ao longo de um dos três vetores no espaço de cores (eixos de confusão: protan, deutan e tritan). Pacientes com DM1 apresentam alteração para os três eixos. O CCT também é aplicado em pacientes com DM2, havendo alteração nos três eixos de confusão (Gualtieri et al., 2013). É provável que o teste de sensibilidade ao contraste cromático verde-vermelho adotado neste estudo, não seja sensível para detecção de possíveis alterações na visão de cores de pacientes com DM1 da amostra.

Com relação à avaliação psicofísica da via ON-OFF, Di Leo e colaboradores (1992) os testes psicofísicos de grade senoidal para avaliação da sensibilidade ao contraste de luminância mostram-se alterados em pacientes com DM1 sem RD em todas as frequências espaciais testadas (0,6;

1,0; 1,4; 2,2; 4,8; 7,1 e 9,6 cpg) sugerindo que o método é sensível para as alterações precoces da retina. A função de sensibilidade ao contraste de luminância é reduzida em pacientes com DM1, com redução significante mente reduzida em 0,2 e 5,0 cpg (Garcia, 2012). Alteração na sensibilidade ao contraste também é encontrada em pacientes DM2 em fase inicial da RD. O método avalia a via magnocelular e a via parvocelular e os resultados mostram redução da sensibilidade ao contraste para as duas vias avaliadas (Gualtieri, 2011).

No caso do presente estudo, os testes psicofísicos utilizados tiveram o objetivo de avaliar a via visual ON e a via visual OFF, através da apresentação de estímulos com incremento e decremento de luz, respectivamente. Os resultados psicofísicos do grupo DM1 foram normais. Enquanto os resultados eletrorretinográficos mostraram alteração das vias ON e OFF em condição mesópica e nenhum dano dessas vias na condição fotópica. Assim as condições de luminância dos testes podem influenciar os resultados nos testes psicofísicos, principalmente para vias ON e OFF. Por outro lado, na revisão de Lee (2011) o estudo da percepção com testes psicofísicos envolvem os mecanismos visuais corticais. Estes mecanismos são diferentes dos mecanismos da retina (aferente), o processamento cortical modifica as informações visuais aferente de diferentes formas, há combinação dessas informações nas propriedades visuais corticais.

A DM1 é uma doença com fisiopatologia discutida em relação ao desenvolvimento da RD (Fong et al., 2004, van Dijk et al., 2010, Barber, Gardner, & Abcouwer, 2011; Nakahara et al., 2013, Kern & Berkowitz, 2015). Essa discussão gira em torno da causa primária da RD ser de origem vascular ou neural e se ambas as condições ocorrem simultaneamente ou em tempos diferentes durante o desenvolvimento da doença (Barber et al., 1998, Barber et al., 2011, Du et al., 2013; Kern & Berkowitz, 2015; Roy et al., 2017). Este estudo corrobora os achados da alteração celular ocorrer antes das alterações vasculares, com alteração eletrorretinográficas nas vias ON, OFF, de luminância e oponentia verde-vermelho.

6.3 DMD e DM1

A DMD apresenta alteração da via ON nas condições mesópica e fotópica e a via OFF alterada apenas na condição mesópica. O desequilíbrio entre as vias ON e OFF na condição fotópica podem ter influenciado as respostas do mecanismo cromático no estímulo de *flicker* heterocromático. Na DM1 sem RD apenas condição mesópica mostrou alteração das respostas nas vias ON e OFF, sugerindo que o dano é mediado pelos mecanismos que envolvem as atividade de bastonetes. A alteração na sensibilidade dos fotorreceptores já é relatada em pacientes de DM tipo 1 e tipo 2 com RD em eletrorretinograma de campo total (Holopigian et al, 1997). Na condição fotópica não há alteração da via ON e OFF. Os resultados da via ON e OFF em diferentes condições de luminância sugerem que a DM1 apresenta alteração não apenas na camada interna, mas também na cama da externa, pois as alterações na condição mesópica confirmam dano na atividade das vias mediadas pelos bastonetes.

As alterações no primeiro harmônico do flicker fotópico podem referir atividade da camada externa, enquanto as respostas do segundo harmônico são consistentes para o modelo de resposta da camada interna da retina (Odom et al., 1996). Assim as diferenças das respostas entre os grupos experimentais podem sugerir que a DMD está envolvida com o prejuízo da camada externa da retina, já que as alterações foram predominantemente no primeiro harmônico. Em DM1 sem retinopatia estão afetadas tanto no primeiro harmônico quanto no segundo harmônico, que relaciona a doença com alteração tanto na camada externa quanto na camada interna.

Os achados desta pesquisa corroboram a hipótese de que a DMD compromete a atividade da camada externa da retina. Já a DM1 os resultados eletrorretinográficos sugerem que além do dano na camada interna, há dano nos mecanismos pós-receptoriais na via cromática e via de luminância.

7 Conclusão

As duas doenças estudadas apresentam alterações funcionais na retina. Há mudança nas vias ON, OFF, cromática e de luminância, mas cada doença com características que as diferenciam nos resultados do eletrorretinograma. Estes sugerem que as respostas aos estímulos dependem do nível afetado na retina. A isoforma Dp 260 está envolvida na alteração principalmente da magnitude de respostas das vias ON e OFF e via cromática. Antes mesmo de alterações vasculares serem diagnosticadas a Diabetes Mellitus altera a magnitude e o tempo de resposta das vias ON e OFF, e na via cromática e de luminância há alteração da fase, mas não na magnitude.

As duas doenças afetam as vias ON e OFF demonstrando que estas vias dependem do bom funcionamento das células da camada externa e interna da retina. Na via cromática a magnitude da resposta é dependente da comunicação celular da camada externa da retina e a via de luminância é influenciada pela camada externa e interna da retina, com alteração da fase.

REFERÊNCIAS

Ahn, A.H., Kunkel, L.M.(1993). The structural and functional diversity of dystrophin. *Nature genetics*, 3, 283-29.

American Diabetes Association. Disponível em: <<http://www.diabetes.org>>. Acesso em: janeiro 2013.

Araszkiewicz, A., Ziolkiewicz, D.Z. (2016). Retinal neurodegeneration in the course of Diabetes-pathogenesis and clinical perspective. *Current Neuropharmacology*, 14, 805-809.

Aroca-Romero, P.; Fernández-Balart, J.; Bernaldiz-Baget, M.; Martinez-Salcedo, I.; Méndez-Marín, I.; Salvat-Serra, M.; Buil-Calvo, J.A. (2008). Changes in the diabetic retinopathy epidemiology after 14 years in a population of type 1 and 2 diabetic patients after the new diabetes mellitus diagnosis criteria and a more strict control of the patients. *Journal diabetes and its Complications*.

Barber, A. J., Lieth E., Khin, S. A., Antonetti. D. A., Buchanan, A. G., Gardner ,T .W. and The Penn State Retina Research Group (1998). Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes: early onset and effect of insulin. *J. Clin. Invest.*, 102 (4), 783-791.

Barber, A. J., Gardner, T. W., Abcouwer, S. F. (2011). The significance of vascular and neuronal apoptosis to the pathology of diabetic retinopathy. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 52 (2).

Barber, A. J. (review 2015). Diabetic retinopathy: recent advances towards understanding neurodegeneration and vision loss. *Science China Life Sciences*, 58 (6), 541-549.

Barboni, M.T.S., Pageni, G., Ventura, D.F., Horns, F., Kremers, J. (2011). Heterochromatic flicker electroretinograms reflecting luminance and cone opponent activity in Glaucoma patients. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 52 (9), 6757-6765.

Barboni, M. T. S., Nagy, B. V., Moura, A. L. A. ,Damico, F. M., Costa, M. F., , M., Kremers, J., Ventura, D. F. (2013). ON and OFF electroretinogram and contrast sensitivity in Duchenne muscular dystrophy. *Ophthalmology and Visual Science*, 54 (5), 3195-3204.

Barboni, M. T. S., Martins, C.M.G., Nagy, B. V., Tsai, T.,. A. ,Damico, F. M., Costa, M. F., Pavanello, R.C.M., Lourenço, N.C.V., Cerqueira, A.M.P., Zatz Kremers, J., Ventura, D. F. (2016). Dystrophin is required for propoer function of

luminance and red-green cone opponent mechanisms in the human retina. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 57 (8), 3581-3587.

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.

Baumgartner, M., Ruiz, D.A. (2008). Distrofia muscular de Duchenne: revisión bibliográfica. *Revista Medicina de Costa Rica y Centroamerica*, 586, 315-318.

Baylor, D. A. (1987). Photoreceptor signals and vision. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 28, 34-49,.

Baylor, D. A., Lamb, T. D., Yau, K. W. (1979). Responses of retinal rod to single photons. *Journal of Physiology*, 288, 613-634.

Bearse, M.A., Adamsn, A.J.A., Han, Y., Schneck, M.E., Ng, J., Bronson-Castain, K., Barez, S. (2006). A multifocal electroretinogram model predicting the development of Diabetic Retinopathy. *Progress in Retina and Eye Research Journal*, 25 (5), 425-448.

Bettecken, T., B., Muller , C.R., Bernardi, G. (1992). Compositional mapping of the human dystrophin-ecoding gene. *Gene*, 122, 329-335.

Blake, D.J., kröger, 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 dystriphin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiological Reviews*, 82, 291-329.

Bloomfield S.A., Dacheux, R.F. (2001). Rod vision: Pathways an processing in the mammalian retina. *Progress in Retinal and Eye Research*, 20 (3), 351-384.

Bowmaker, J. K., Dartnall, H. J. A. (1980). Visual pigments of rods and cones in a human retina. *Journal of Physiology*, 298, 501-511.

Brown, P. K., Wald, G. (1964). Visual pigments in single rods and cones of human retina – direct measurements revels mechanisms of human night and color vision. *Science*, 144, 45-47.

Boycott, B. B., Wässle, H. (1991). Mophological classification of bipolar cells of the primate retina. *European Journal of Neuroscience*, 3 (11), 1069-1088,.

Buck S L (2003) Rod-cone interactions in human vision. Em: 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 photoreceptor. In Chalupa , LM & Werner JS (Eds). The visual neurosciences (p. 215-233). Cambridge: MIT Press.

Busik, J. V., Mohr, S., Grant, M. B. (2008). Hyperglycemia-induced reactive oxygen species toxicity to endothelial cells is dependent on paracrine mediators. *Diabetes*, 57, 1952-1965.

Calkins, D. J., Scheltn, S. J., Tsukamoto, Y., Sterling, P. (1994). M and L cones in macaque fovea connect to midget ganglion cells by different numbers of excitatory synapses *Nature*, 371.

Campbell, K.P. (1995). Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell*, 80, 675-679.

Chan, T. L., Grünert, U. (1998). Horizontal cell connections with short wavelength – sensitive cones in the retina: a comparison between New World and Old World primates. *Journal of Comparative Neurology*, 393, 196-209.

Chelly, J., Hamard, G., Koulakoff, A., Kaplan, J.C., Kahn, A. (1990). Berwaldnetter, Y. Dystrophin gene transcribed from different promoters in neuronal and glial-cells. *Nature*, 344, 64-65.

Cibis, G.W., Fitzgerald, K.M., Harris, D.J., Rothberg, P.G., Rupanis, M. (1993). The effects of dystrophin gene mutations on ERG mice and humans. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 34, 3646-3652.

Cibis, G.W., Fitzgerald, K.M. (2001). The negative ERG is not synonymous with night blindness. *Transaction of the American Ophthalmological Society*, 99, 171-175.

Costa, M.F., Ventura, D.F., Pavanello, R.C.M., Cerqueira, A., Zatz, M. (2004). Color vision phenotype in Duchenne muscle dystrophy. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 45(424).

Costa, M.F., Oliveira, A.G.F., Feitosa-Santana, C. Zatz, M., Ventura, D.F. (2007.). Red-green color vision impairment in Duchenne Muscular Dystrophy. *American Journal of Human Genetics*, 80, 1064-1075.

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 and Neuroscience*, 4, 67-74.

Dacey, .D M., Lee, B. B. (1994). The “blue-on” opponent pathway in primate retina originates from a distinct bistratified ganglion cell type. *Nature*, 368, 731-735.

Dacey, D. M., Lee, B. B., Stafford, D. K., Pokorny, J., Smith, V. C. (1996). Horizontal cells of the primate retina: cone specificity without a spectral opponency. *Science*, 271, 656-659.

Dacey, D. M. (1999). Primate retina: Cell types, circuits and color opponency. *Retinal and Eye Research*, 18 (6), 737-763.

Dacey, D. M., Packer, O. S. (2003). Colour coding in the primate retina: diverse cell types and cone-specific circuitry. *Current Opinion in Neurobiology*, 13, 421-427.

Dalkilic, I., Kunkel, L. M. (2003). Muscular dystrophies: genes to pathogenesis. *Current Opinion in Genetics & Development*, 13 (3), 231-238.

De Becker, I., Riddell, D.C., Dooley, J.M., (1994). Tremblay, F. 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,

Diabetic Retinopathy Study (1981). Diabetic retinopathy study. Report Number 6. Design, methods, and baseline results. Report Number 7. A modification of the Airlie House classification of diabetic retinopathy. Prepared by the Diabetic Retinopathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 21 (1 Pt 2), 1-226.

Di Leo M. A. S., Caputo S., Falsini B., Porciatti V., Minnella A., Geci A.V., Ghirlanda G. (1992). Nonselective loss of contrast sensitivity in visual system testing in early type I Diabetes. *Diabetes Care*, 15(5), 620-625.

Dooley, J. M., Gordon, K. E., Dodds, L., MacSween, J. (2010). Duchenne muscular dystrophy: a 30-year population-based incidence study. *Clin Pediatr*, 49 (177).

Dosso A A; Bonvin E R; Morel Y, Golay, A; Assal, J P; Leuenberger, P M. (1996). *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 234 (5), 300-305.

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.

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.

Du, Y., Veenstra, A., Palczewski, K., Kern, T. S. (2013). Photoreceptor cells are major contributors to diabetes-induced oxidative stress and local inflammation in the retina. *PNAS*, 110 (41).

El-Asrar, A. M. A., Dralands, L., Missotten, L., Al-Jadaan, I. A., Geboes, K. (2004). Expression of apoptosis markers in the retinas of human subjects with diabetes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 45 (8).

Emery, A. E. (1989). Clinical and molecular studies in Duchenne muscular dystrophy. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 306, 15-28.

Emery, A.E.H. Muscular dystrophy – an evolving concept. In A.E.H. Emery (Ed.). *The muscular dystrophies* (pp.1-9). 2001. New York: Oxford University Press.

Emery, A. E. H. (2002). The muscular dystrophies. *The Lancet*, 359, 687-695.

Fong, D.S.; Aiello, L.; Gardner, T.W.; King, G.L.; Blankenship, G. (2004). Retinopathy in diabetes. *Diabetes Care*, 27.

Fritzgerald, 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/despolarizing bipolar cell pathway. *The Journal of Clinical Investigation*, 93, 2425-2430.

Garcia, V.D. (2012) *Visão de cores, sensibilidade ao contraste e eletroretinografia multifocal em indivíduos com Diabetes Mellitus tipo 1*. Dissertação de mestrado, Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo.

Gastinger, M.J., Kunselman, A.R., Conboy, E.E., Bronson, S.K., Barber, A.J. (2008). Dendrite remodeling and other abnormalities in the retinal ganglion cell of Ins2Akita Diabetic Mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 49 (6), 2635-2642.

Green, F. D., Ghafour, I. M., Allan, D., Barrie, T., McClure, E. (1985) Foulds, W S. Colour vision of diabetics. *British Journal of Ophthalmology*, 69 (7), 533-536.

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. (2008). *Avaliação funcional da visão de pacientes diabéticos em estados pré e pós retinopatia diabética*. Tese de Doutorado. Instituto de Psicologia. Universidade de São Paulo.

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 and Visual Science*, 52 (2), 1151-1155.

Gualtieri, M., Feitosa-Santana, C., Lago, M., Nishi, M., Ventura, D, F. (2013). Early visual changes in diabetic patients with no retinopathy measured by color discrimination and electroretinography. *Psychology & Neuroscience*, 6 (2), 227-234.

Goldchild, A. K., Chan, T. L., Grünert, U. (1996) Horizontal cell connections with short-wavelength-sensitive cones in macaque monkey retina. *Visual neuroscience*, 13, 833-845.

Hack, I., Peichl, L., Brandstätter, J.H. (1999). An alternative pathway for rod signals in the rodent retina: rod photoreceptor, cone bipolar cells, and the localization of glutamate receptors. *PNAS*, 96 (24), 14130-14135.

Hardy, K J; Lipton, J; Scase, M O; Foster D H; Scarpello, J H B. (1992). Detection of colour vision in uncomplicated type 1diabetics patients with angiographically normal retinas. *British Journal of Ophthalmology*, 76, 461-464.

Hoffman, E. P., Bronson, A., Levin, A. A., Takeda, S., Yokota, T., Baudy, A. R., Connor, E. M. (2011). Restoring dystrophin expression in Duchenne muscular dystrophy muscle: progress in exon skipping and stop codon read through. *The American Journal of Pathology*, 179 (1), 12-22.

Holopigian, K; Seiple, W; Lorenzo M; Carr, R. (1992).A Comparison of Photopic and Scotopic Electroretinographic Changes in Early Diabetic Retinopathy. *Investigative Ophtha Imology & Visual Science*, 33 (10).

Human Genome Project:

http://web.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/project/info.shtml
em janeiro de 2013.

Jacob, M.M., Pangeni, G., Gomes, B.D., Souza, G.S., Filho, M.S., Silveira, L.C.L., Maguire, J., Parry, N.R.A., McKeefry, D.C., Kremers, J. (2015). The

spatial properties of L- and M-cone inputs to electroretinograms that reflect different types of post-receptoral processing. *PLoS ONE*, 1-15.

Kermer, P., Klöcker, N., Labes, M., Bähr, M. (2000). Insulin-Like Growth Factor-I Protects Axotomized Rat Retinal Ganglion Cells from Secondary Death via PI3-K-Dependent Akt Phosphorylation and Inhibition of Caspase-3 *In Vivo*. *Journal of Neuroscience*, 20 (2), 722-728.

Kern, T. S., Berkowitz, B. A. (2015). Photoreceptor in diabetic retinopathy. *Journal of Diabetics Investigation*, 6 (4), 371-380.

Klemp, K., Sander, B., Brockhoff, P. B., Vaag, A., Lund-Andersen, H., Larsen, M. (2005). The multifocal ERG in diabetic patients without Retinopathy during Euglycemic Clamping. *Visual Neuroscience*, 46, 2620-2626.

Kondo, M., Sieving, P.A. (2010). Primate photopic sine-wave flicker ERG: vector modeling analysis of component origins using glutamate analogs. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 42 (1), 305-312.

Kondo, M., Sieving, P.A. (2002). Post-Photoreceptoral activity dominates primate photopic 32 Hz ERG for sine-, square-, and pulsed stimuli. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 43 (7), 2500-2507.

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

Kurtenbach, A., Schiefer, U., Neu, A., Zrenner, A. (1999). Development of brightness matching and colour vision deficits in juvenile diabetics. *Vision Research* 39, 1221-1229.

Kurtenbach, A., Langrova, H., Zrenner, E. (2000). Multifocal oscillatory potentials in type 1 diabetes without retinopathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 41 (10), 3234-3241.

Lee B B, Valberg a, Tigwell D A, Tryti J. An account of responses of spectrally opponent neurons in macaque lateral geniculate nucleus to successive contrast. *Proceedings of the Royal Society London B*, v. 230, pp 293-314, 1987.

Lee, B. B., Martin, P. R., Grünert, U. (2010). Retinal connectivity and primate vision. *Progress in Retinal and Eye Research*, 29, 622-639.

Lieth, E., Gardner, T.W., Barber, A.J., Antonetti, D.A. (2000). Retinal neurodegeneration: early pathology in diabetes. *Clinical and Experimental Ophthalmology*, 28, 3-8.

Liska, V., Dostalek, M. (1999). Are contrast sensitivity function impaired in insulin dependent diabetics without diabetic retinopathy? *Acta Medica*, 42, 133-138.

Lung, J.C.Y., Swann, P.G., Chan, H.H.L. (2016). The multifocal On- and Off-responses in the human Diabetic Retina. *PLoS ONE*, 11 (5), 1-10.

Martins, C.M.G., Tsai, T., Barboni, M.T.S., Costa, M.F., Nagy, B., Ventura, D.F., Kremers, J. The influence of stimulus size on the heterochromatic modulation electroretinograms. *Journal of Vision*, 16(8), 1-11.

Martinville, B., Kunkel, L. M., Bruns, G., Morlé, F., Koenig, M., Mandel, J. L., Horwich, A., Latt, S. A., Gusella, J. F., Housman, D., Francke, U. (1985) Localization of DNA sequences in region Xp21 of the human X chromosome: Search for molecular markers close to the Duchenne muscular dystrophy locus. *Am. J. Hum. Genet.*, 37, 235-249.

Mehler, M. F. (2000). Brain dystrophin, neurogenetics and mental retardation. *Brain Research Reviews*, 32, 277-307.

Miike, T., Miyatake, M., Zhao, J.E., Yoshioka, K., Uchino, M. (1989). Immunohistochemical dystrophin reaction in synaptic regions. *Brain & Development*, 11, 344-346.

Morigiwa, K., Vardi, N. (1999). Differential expression of ionotropic glutamate receptor subunits in the outer retina. *The Journal of Comparative Neurology*, 405, 173-184.

Muntoni, F., Torelli, S., Ferlini, A. (2003). Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurology*, 2 (12), 731-740,

Nakahara, T., Mori, A., Kurauchi, Y., Sakamoto, K., Ishii, K. (2013). Neurovascular interactions in the retina: physiological and pathological roles. *Journal of Pharmacological Sciences*, 123, 79-84.

Nakajima, Y., Iwakabe, H., Akasawa, C., Nawa, H., Shigemotom, 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.

Neel, J. V. (1962). Diabetes Mellitus: A "Thrifty" Genotype Rendered Detrimental by "Progress"? *The American Journal of Human Genetics*, 14; 353-362.

Nelson, R., Famiglietti, E. V., Kolb, H. (1978). Intracellular staining reveals different levels of stratification for on- and off- ganglion cells in cat retina. *Journal of Neurophysiology*, 41, 472-483.

Nomura, A., Shigemoto, R., Nakamura, Y., Okamoto, M., Mizuno, N., Nakanishi, S. T. (1994). Developmentally regulate postsynaptic localization of a metabotropic glutamate receptor in rat rod bipolar cells. *Cell*, 77, 361-369.

Odom, J.V., ReitsD., Burgers, N., Riemslag, F.C.C. (1992). Flicker electroretinograms: a systems analytic approach. *Optometry and Vision Science*, 69 (2), 106-116.

Organização Mundial da Saúde (OMS) disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>> acesso em agosto de 2015.

Pangeni, G., Horn, F.K., Kremers, J. (2010). A new interpretation of components in the ERG signals to sine wave luminance stimuli at different temporal frequencies and contrasts. *Visual Neuroscience*, 27, 79-90.

Pangeni, G., Kremers, J. (2013). Human photopic ON- and OFF-ERG responses elicited by square wave and sawtooth stimuli. *Psychology and Neuroscience*, 6 (2), 165-178.

Phipps, J.A., Fletcher, E.L., Vingrys, A.J. (2004). Paired-Flash identification of rod and cone dysfunction in diabetic rat. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 45 (12), 4592-4600.

Phipps, J.A., Yee, P., Fletcher, E.L., Vingrys, A.J. (2006). Rod photoreceptor dysfunction in diabetes: activation, deactivation, and dark adaptation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 47 (7), 3187-3194.

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.

Rapaport, D., Lederfein, D., Dunnen, J. T., Grootscholten, P. M., Van Ommen, G. J. B., Fuchs, O., Nudel, U., Yaffe, D. (1992). Characterization and cell type distribution of a novel, major transcript of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Differentiation*, 49, 187-193.

- Ricotti, V., Jäggle, H., Theodorou, M., Moore, A.T., Muntoni, F., Thompson, D.A. (2016). Ocular and neurodevelopmental features of Duchenne muscular dystrophy: a signature of dystrophin function in the central nervous system. *European Journal of Human Genetics*, 24, 562-568.
- 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*, v. 26, pp 181-186.
- Rodieck, R. W. (1998). The first steps in seeing. Sunderland: Sinauer Associates.
- Roy, S., Kern, T. S., Song, B., Stuebe, C. (2017). Mechanistic Insights into Pathological Changes in the Diabetes Retina: implications for targeting diabetic retinopathy. *The American Journal of Pathology*, 187 (1).
- Santana, F. C., Paramei, G. V., Nishi, M., Gualtieri, M., Costa, M. F., Ventura, D. F. (2010). Color vision impairment in type 2 diabetes assessed the D-15d test and the Cambridge Colour Test. *Ophthalmic and Physiological Optics*, 30 (5), 717-723.
- Satz, J., Campbell, K.P. (2008). Unraveling the ribbon synapse. *Nature Neuroscience*, 11, 857-859.
- Schmitz, F., Drenckhahn, D. (1997). Dystrophin in the retina. *Progress in Neurobiology*, 53, 547-560.
- Schnapf, J. L., Kraft, T. W., Baylor, D. A. (1987). Spectral sensitivity of human cone photoreceptors. *Nature*, 325, 439-441.
- 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. Em: L M Chalupa & J S Werner (Eds). The visual neurosciences (pp 234-259). Cambridge : MIT Press.
- Tadayoni R, Rendon A, Soria-Jasso L E. (2012).Dystrophin Dp71: The smallest but multifunctional Product of the Duchenne Muscular Dystrophy Gene. *Molecular Neurobiology*, 45, 43-60,

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.

Troland, L.T. (1917). On the measurement of visual stimulation intensities. *Journal of Experimental Psychology*, 11 (1), 1-33.

Tsai, T., Barboni, M.T.S., Nagy, B.V., Roux, M.J., Rendon, A., Ventura, D.F., Kremers, J. (2016). Asymmetrical functional deficits of ON and OFF retinal processing in the mdx mdx3Cv mouse model of Duchenne Muscular Dystrophy. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 57 (13), 5788-5798.

Tuomilehto, J., Lindström, J., Eriksson, J. G., Valle, T.T., Hämäläinen, H., Illane-Parikka, P., Keinänen-Kiukkaanniemi, S., Laakso, M., Louheranta, A., Rastas, M., Slaminen, V., Uusitupa, M. (2001). Prevention of type 2 diabetes mellitus by change in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *The New England Journal of Medicine*, 344 (18), 1343-1350.

Ueda, H., Baba, T., Terada, N., Kato, Y., Tsukahara, S., Ohno, S. (1997a). Dystrophin in rod spherules; submembranous dense regions facing bipolar cells processes. *Histochemistry and Cell Biology*, 108, 243-248.

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., Baba, T., Kashiwagi, K., Lijima, H., Ohno, S. (2000a). Dystrobrevin localization in photoreceptor axon terminals and at blood-ocular barriers 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.

Van Dijk, H.W., Verbraak, F.D., Hok, P.H.B., Gravin, M.K., Sonka, M. Lee, K., DeVries, H., Michels, R.P.J., van Velthoven, J., Schlingemann, R.O., Abramoff, M.D. (2010). Decreased retinal ganglion cell layer thickness in patients with type 1 Diabetes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51 (7), 3660-3665.

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., 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.

Verbovaia, L.V., Razin, S.V. (1997). Mapping of replication origins and termination sites in the Duchenne muscular dystrophy gene. *Genomics*, 45, 24-30.

Völgyi, B., Deans, M. R., Pauli, D. L., Bloomfield, S.A. (2004). Convergence and segregation of the multiple Rod pathway in mammalian retina. *Journal of Neuroscience*, 24 (49), 11182-11192.

Yu, J., Wang, L., Weng, S., Lang, X., Zhang, D., Zhong, Y. (2013). Hyperactivity of ON-type retinal ganglion cells in Streptozotocin-induced diabetic mice. *PLOSone*, 8 (9).

Waite, A., Brown, S. C., Blake, D. J. (2012). The dystrophin-glycoprotein complex in brain development and disease. *Trends in Neurosciences*, 35 (8).

Wässle, H., Boycott, B. B. (1991). Functional architecture of the mammalian retina. *Physiological Reviews*, 71, 447-480,

Wässle, H. (2004). Parallel processing in the mammalian retina. *Nature Reviews*, 5, 1-11.

Wersinger, E., Bordais, A., Schwab, Y., Sene, A., Bénard, R., Alunni, V., Sahel, J., Rendon, A., Roux, M.J. (2011). Reevaluation of Dystrophin localization in the mouse retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52 (11), 7901-7908.

Whitmire, W., Al-Gayyar, M.M.H., Abdelsaid, M., Yousufzai, B.K., El-Remessy, A.B. (2011). Alteration of growth factor and neuronal death in diabetic retinopathy: what we have learned so far. *Molecular Vision*, 17, 300-308.

Wilson M. Retina synapses. Em: L M Chalupa & J S Werner (Eds). The visual neurosciences (pp 279-303). Cambridge: MIT Press, 2003.

Zachi, E C. (2009). *Avaliação neuropsicológica de pacientes com Distrofia Muscular de Duchenne*. Tese de Doutorado. Instituto de Psicologia. Universidade de São Paulo.

Zaghloul. K.A., Boahen, K., Demb, J. B. (2003). Different circuits for ON and OFF retinal ganglion cells cause different contrast sensitivities. *The Journal of Neuroscience*, 23 (7), 2645-2654.

Zatz, M., Lange, K., Spence, M.A. (1977). Frequency of Duchenne muscular dystrophy carriers. *Lancet*, 1, 759.

ANEXOS

ANEXO 1 – The influence of stimulus size on heterochromatic modulation electroretinograms

Artigo publicado em Journal of Vision (2016), 16 (8), 1-11.

Anexo 1 – The influence of stimulus size on heterochromatic modulation electroretinograms

Artigo publicado em Journal of Vision (2016), 16 (8), 1-11.

The influence of stimulus size on heterochromatic modulation electroretinograms

Cristiane Maria Gomes Martins

Department of Ophthalmology,
University Hospital Erlangen, Erlangen, Germany
Department of Experimental Psychology,
University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

Tina Tsai

Department of Ophthalmology,
University Hospital Erlangen, Erlangen, Germany

Mirella Telles Salgueiro Barboni

Department of Experimental Psychology,
University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

Marcelo Fernandes da Costa

Department of Experimental Psychology,
University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

Balázs Nagy

Department of Experimental Psychology,
University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil
Department of Mechatronics,
Optics and Engineering Informatics,
Faculty of Mechanical Engineering,
Budapest University of Technology and Economics,
Budapest, Hungary

Dora Fix Ventura

Department of Experimental Psychology,
University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

Jan Kremers

Department of Ophthalmology,
University Hospital Erlangen, Erlangen, Germany
Department of Anatomy II,
Friedrich-Alexander University Erlangen-Nürnberg,
Erlangen, Germany
Bradford School of Optometry and Vision Sciences,
Bradford University, Bradford, UK

When combined with the electroretinogram (ERG), the heterochromatic flicker photometry procedure allows an objective in vivo assessment of postreceptoral activity. Responses evoked at intermediate (approximately 12 Hz) and high (>30 Hz) temporal frequencies reflect the red-green cone opponent (possibly parvocellular) and the luminance (possibly magnocellular) responses, respectively. Previously, we found that cone-isolating

stimuli at intermediate temporal frequencies elicited ERG responses with similar amplitudes and phases for different spatial arrangements of the stimuli, whereas response amplitudes at high temporal frequencies were positively correlated with stimulus size. The purpose of this study was to investigate whether the influence of stimulus size was confined to cone-isolating stimuli or whether it was a general feature of heterochromatic

Citation: Martins, C. M. G., Tsai, T., Barboni, M. T. S., da Costa, M. F., Nagy, B., Ventura, D. F., & Kremers, J. (2016). The influence of stimulus size on heterochromatic modulation electroretinograms. *Journal of Vision*, 16(8):13, 1–10, doi:10.1167/16.8.13.

doi: 10.1167/16.8.13

Received February 25, 2016; published June 14, 2016

ISSN 1534-7362

stimulation. Furthermore, we aimed to determine the smallest spatial extent for a significant response in the two postreceptoral mechanisms. Monocular ERGs were recorded to red–green counterphase modulated sinusoidal stimuli (mean luminance of 200 cd/m²) presented at 12 and 36 Hz at different stimulus sizes. At each stimulus condition, a series of ERGs were recorded with the red-contrast fraction (F_R) [$F_R = C_R / (C_R + C_G)$] of the stimulus varying between 0.0 and 1.0. Response amplitudes at 36 Hz changed with F_R for all subjects, exhibiting a V-shaped amplitude profile with a minimum close to the psychophysics-based isoluminance, where the ERG phase changed by 180°. As stimulus size decreased, the amplitudes to 36 Hz also decreased. In contrast, amplitudes and phases at 12 Hz generally were constant for all values of F_R . These amplitudes were invariant to stimulus sizes larger than 10° but decreased with decreasing stimulus size below 10°. Phase also changed in this range. Thus, luminance pathway ERG responses (36 Hz) show direct dependency on stimulus size, whereas chromatic pathway responses (12 Hz) are independent of the stimulus size above 10°.

Introduction

In the human visual system, signals from the different photoreceptors are distributed in different pathways for parallel processing. Cone signals are processed in several retinogeniculate pathways that are important for visual perception, of which the magnocellular (luminance) and parvocellular (red–green color opponent) pathways are the main streams because the majority of retinal ganglion cells and lateral geniculate nucleus cells belong to these pathways (Dacey, 2000; Gouras & Zrenner, 1979; Kaplan, Lee, & Shapley, 1990; Lee, Martin, & Grunert, 2010).

Electroretinography (ERG) provides a noninvasive electrophysiological assay of retinal function. The technique has been used extensively for clinical assessment of the integrity of the human retina because it provides information about light-triggered electrical activity of the different neurons in the eye (Armington, 1974). Recently, the ERG technique was also found to reflect activity in the cone opponent and luminance pathways, expanding the scope of the technique to processing in retinogeniculate pathways (Kremers & Link, 2008; Kremers, Rodrigues, Silveira, & da Silva-Filho, 2010; Parry et al., 2012).

Heterochromatic flicker photometry is a psychophysical method used to determine the luminance of a stimulus. Typically, two different colored stimuli are modulated in counterphase (i.e., heterochromatically) at high temporal frequency. The modulation in the stimuli is maximal (i.e., at 100% Michelson contrast), and the mean luminance of one of the two lights is

changed by the observer. By definition, the two lights are isoluminant when the perceived flicker is minimal. The work of Jacobs and colleagues (Jacobs & Deegan, 1997; Jacobs & Neitz, 1993; Jacobs, Neitz, & Krogh, 1996) has shown that this stimulus paradigm can also be employed to perform photometry based on ERG signals; ERG response amplitudes are minimal at isoluminance. However, a disadvantage of the heterochromatic flicker photometry technique is that changing the mean luminance of one of the two lights also changes the state of adaptation in the eye.

A related method that evades this problem is heterochromatic modulation photometry (Huchzermeyer et al., 2014; Pokorny, Smith, & Lutze, 1989). In this method, the mean luminance of the two stimuli is fixed but the ratio of their contrasts is varied. The modulations in the two stimuli are isoluminant when perceived flicker is minimal. Because the mean luminance is not changed in heterochromatic modulation photometry, the state of adaptation remains constant. It was found that ERG signals were also minimal for contrast ratios that resulted in subjective isoluminance (as in the psychophysical experiments), provided that the measurements were performed at high temporal frequencies (>30 Hz; Kremers et al., 2010). At the ERG amplitude minimum, the phases shifted by about 180°. At frequencies of about 12 Hz, no ERG minimum was found. In fact, response amplitudes and phases were relatively stable for all contrast ratios, indicating that the ERGs reflected a cone opponent mechanism. These results were in agreement with those of other measurements (Kremers & Link, 2008; Parry et al., 2012) showing the possibility of measuring L- and M-cone opponency-based (red–green chromatic) signals at 12 Hz and luminance-based (luminance) signals at frequencies above 30 Hz.

Recently, work in our lab has shown that the two mechanisms also have different dependencies on the spatial configuration of the stimuli (Jacob et al., 2015). The high-frequency ERGs depended strongly on the stimulus area, whereas the stimulus area had hardly any influence on the 12-Hz ERGs (neither on their amplitudes nor on their phases). These findings were obtained with L- and M-cone isolating circular stimuli between 10° in diameter and full field (FF) as well as for annular stimuli with 70° outer diameter and varying inner diameter. Obviously, the responses should change and ultimately disappear if the stimulus area is approaching zero. The purpose of the present study was to explore a larger range of stimulus areas in order to study the spatial dependency of the two ERG mechanisms in more detail. For this, responses with better signal-to-noise ratios than those obtained with the cone-isolating stimuli were required. We therefore used the above-mentioned heterochromatic modulation photometry stimulus paradigm, with which larger

Figure 1. Representation of five different stimulus conditions: F_R 0.0, 0.2, 0.5, 0.8, and 1.0. In condition 0.0 (left), the red light-emitting diode (LED) was constant and the green LED was modulated with 100% contrast. In condition 0.5 (middle), both the red and green LEDs were modulated with 50% contrast in counterphase. In condition 1.0 (right), the red LED was modulated with 100% contrast and the green LED was constant.

contrasts can be reached. The second purpose of the present study was to compare the results of the two stimulus paradigms (cone-isolating stimuli vs. heterochromatic modulation) in order to establish whether the two spatial characteristics genuinely can be attributed to two different retinal pathways.

Method

Subjects

Five healthy volunteers (three males and two females; aged 26–54 years) participated in this study. The study was approved by the ethics committee of the Medical Hospital Erlangen, Friedrich-Alexander University (329_12B), and adhered to the tenets of the Declaration of Helsinki. Subjects were informed and signed the consent prior to the experiments. All subjects had normal color vision as established with the anomaloscope (Oculus Optikgeräte GmbH, Wetzlar, Germany).

Visual stimulation

The stimuli were provided by a Ganzfeld (Q450SC; Roland Consult Stasche & Finger GmbH, Brandenburg, Germany) stimulator equipped with six different colored light-emitting diodes and controlled by RETIport software (Roland Consult). In this study, only the red (638 nm; CIE1931: $x = 0.6957$, $y = 0.2966$) and green (523 nm; CIE1931: $x = 0.2016$, $y = 0.7371$) light-emitting diodes were used. Both the red and green stimuli had mean luminances of 100 cd/m². Mean hue was yellow (CIE coordinates: $x = 0.5813$, $y = 0.4030$). The stimuli were 12- and 36-Hz sine wave modulations of the red (with Michelson contrast R) and green (with Michelson contrast G) lights in counterphase (Barboni, Pageni, Ventura, Horn, & Kremers, 2011; Barboni, Ventura, & Kremers, 2010; Kremers et al., 2010). At each stimulus condition, a series of ERGs were recorded, varying in their fraction of red modulation contrast of the total modulation contrast [$F_R = C_R / (C_R + C_G)$] from 0.0 (i.e., green

stimulus was modulated with 100% Michelson contrast and red stimulus was constant) to 1.0 (i.e., red stimulus was modulated with 100% Michelson contrast and green stimulus was constant) in steps of 0.1 (Figure 1). The total amount of R and G contrast was constant at 100% ($C_R + C_G = 100\%$). The 0.5 condition was measured twice at different instances during the measurements to check for stability in the recording conditions.

The measurements were repeated for different stimulus sizes: FF and circular stimuli with 70°, 50°, 30°, and 10° diameter. Three additional stimulus sizes were measured for the 12-Hz responses: 7.5°, 5°, and 2.5° diameter. These were custom made with black cardboard and positioned at a 3-cm distance from the subject, with the central point aligned with the circular opening of the stimulator.

ERG recordings

ERGs were recorded monocularly from a dilated eye (0.5% tropicamide; Pharma Stulln GmbH, Stulln, Germany). The subjects' heads were stabilized by a chin rest. Three electrodes were used: Gold cup electrodes filled with electrode paste (DO Weaver & Co., Aurora, CO) were placed on the forehead (ground electrode) and on the ipsilateral temple (reference electrode) after cleaning the skin with Nuprep abrasive gel (DO Weaver & Co.), and a corneal DTL fiber (active electrode) was placed over the lower conjunctiva from the outer to inner canthus of the eye. Impedance of the reference and active electrodes was below 5 kΩ.

ERG signals were recorded using the RETIport system, were amplified 100,000 times, bandpass filtered between 1 and 300 Hz, and digitized at a rate of 1024 Hz. The intrusion of 50-Hz signals from the mains was small so that no notch filter was needed.

For FF and 70° stimulation, ERG responses were averages of at least 40 sweeps at 12 Hz and 20 sweeps at 36 Hz, with each sweep lasting 1 s. The number of sweeps per average response was increased to 120 for 36-Hz recordings with smaller stimulus sizes between 50° and 10° and to at least 160 for 12-Hz recordings with stimulus sizes between 7.5° and 2.5°.

Data analysis

All signals were Fourier analyzed with a self-written MATLAB program (R2013b, MathWorks, Natick, MA). The amplitudes and phases of the first harmonic (fundamental) component were used to describe the responses. A response was accepted only when the signal-to-noise ratio (quantified by the ratio of the fundamental component and the average of the component amplitudes at adjacent frequencies; e.g., values at 11 and 13 Hz for 12-Hz responses) was ≥ 2 . SigmaPlot (version 12.0; Systat Software GmbH, Erkrath, Germany) was used for linear regression analyses and graph presentation.

Results

Figure 2 shows individual response amplitudes (left) and phases (right) to the 36-Hz stimuli for the different stimulus sizes as a function of F_R for the five subjects. A model that assumed that the responses were vector averages of L- and M-cone driven responses was fitted to the data. Similar models were used previously to describe interactions of responses driven by different photoreceptor types (Kremers, Usui, Scholl, & Sharpe, 1999; McAnany, Park, & Cao, 2015; Park, Cao, Collison, Fishman, & McAnany, 2015) or different postreceptoral mechanisms (Kondo & Sieving, 2001; Kremers et al., 2010). The model was fitted to response data in vector space in which responses are represented by vectors with lengths determined by the response amplitudes and the angles with the positive abscissa reflecting the response phases. The fits were performed by minimizing the squared distances between model and measured responses. The model contained four free parameters: the amplitudes and phases of L- and M-cone driven responses. The fits were performed on all subjects and conditions. All fits were well constrained by the data.

From these fits we obtained estimates of L-response fractions: $[G_L/(G_L + G_M)]$, in which G_L and G_M are L- and M-cone driven ERG response amplitudes or gains. These fractions are given in Table 1. The data suggest a decrease in L-response fraction with a decrease in stimulus size from FF to 70°. A further decrease in stimulus size did not result in a systematic change of L-response fraction.

The grouped mean (and standard deviation) of these response amplitude and phase data is given in Figure 3. It can be seen from both individual and grouped data that the response amplitudes strongly depended on F_R . For all stimulus sizes tested, the amplitudes were the largest at F_R 0.0 and 1.0, while the amplitudes were minimal at intermediate conditions between 0.3 and

0.5. At the F_R condition where the amplitude was minimum, response phases changed by about 180°. These results are in agreement with earlier studies that involved only FF stimulation (Barboni et al., 2010, 2011; Kremers et al., 2010).

In addition, the response amplitudes were positively correlated with stimulus size. They decreased by a factor of about 50 when stimulus size decreased from FF to 10° diameter. The response phases did not change strongly with stimulus size. The phase change at the amplitude minimum appeared to be more abrupt for FF and for the 10° stimuli. These results are in agreement with previous data on ERG recordings to high-frequency L- and M-cone isolating stimuli (Jacob et al., 2015).

Figure 4 shows 12-Hz data in the same format as Figure 2 for every subject. However, the measurements were performed with three additional stimulus sizes down to 2.5° in diameter. Grouped results (and standard deviation) are displayed in Figure 5. In contrast to 36-Hz data, the response amplitudes and phases to the intermediate flicker were relatively constant for all conditions. This was found to be the case for all subjects, which suggests that the responses reflect cone opponent chromatic mechanisms because the red–green chromatic content in the stimulus did not change in either amplitude or phase. However, there were some small but systematic changes at intermediate stimulus sizes, where a decrease in response amplitude and phase can be observed with increasing values of F_R . This trend was not found for the FF and 2.5° diameter stimuli.

Stimulus size between FF and 10° did not influence the response amplitudes. Below 10°, however, amplitude responses decreased with decreasing stimulus size for all subjects. With a 2.5° stimulus, the responses were about a factor of 10 smaller than those measured with stimuli larger than 10° in diameter. The response phases did not change dramatically for stimuli between FF and 30° diameter either, but a systematic phase change was noted also for smaller stimuli. The data for stimuli of 10° and larger are in agreement with the data from Jacob et al. (2015), where the responses at 12 Hz reflect a chromatic mechanism that were constant for stimuli larger than 10° in diameter. The data extend the previous data in that the response amplitudes and phases strongly change for stimuli smaller than 10° in diameter. However, it was surprising that measurements could be performed with stimuli with diameters as small as 2.5°.

To quantify the dependency of response amplitude on stimulus size, the mean amplitudes for three stimulus conditions ($F_R = 0, 0.5$, and 1) are plotted as a function of the stimulus diameter in Figure 6. For the 36-Hz data we also used the amplitudes at the stimulus condition that resulted in a minimal response, thereby

Figure 2. Response amplitudes (left; logarithmic scale) and phases (right) of ERGs to 36-Hz stimulation versus F_R . The plots are color coded for the different stimulus sizes used (see legend) and shown separately for five different observers (S1–S5). The curves are fits of a vector addition of L- and M-cone driven responses to the data.

taking into account that this minimum, probably corresponding to the individual isoluminance point, may depend on individual differences and on stimulus size. In this double logarithmic plot, the slope of the linear regression quantifies the eccentricity-dependent inhomogeneity of the retinal responses. If retinal

responses were homogeneous, then the response amplitudes would be proportional with the stimulus area ($R = k \cdot S^2$, where R is response amplitude and S is stimulus diameter) and a slope of 2 would be expected: $\log(R) = \log(k) + 2\log(S)$. Figure 6 shows a linear regression at 36 Hz (upper graph). The slopes were

Stimulus size	S1	S2	S3	S4	S5
Full field	0.97	0.89	0.96	0.85	0.92
70°	0.91	0.90	0.90	0.67	0.85
50°	0.80	0.90	0.81	0.71	0.86
30°	0.85	0.84	0.86	0.71	0.96
10°	1.00	0.86	0.78	0.65	0.83

Table 1. Fraction of the L-cone driven responses [$G_L/(G_L + G_M)$] obtained from model fits to ERG data for different subjects and stimulus sizes.

between 1.1 and 1.6, similar to those found for cone isolating stimuli (Jacob et al., 2015).

The lower graph shows that for 10° stimuli (log diameter 1.0) and larger, the response amplitudes at 12 Hz did not change. For smaller stimuli, the linear regressions had slopes between 0.95 and 1.5, indicating that the response amplitudes were more proportional with stimulus diameter than with its area. Figure 7 shows the phases of the 36-Hz (upper graph) and 12-Hz (lower graph) responses as a function of stimulus diameter and for the three stimulus conditions, confirming the above observation that they were invariant at 36 Hz but changed for stimuli smaller than 30° at 12 Hz.

Discussion

The purpose of the present study was twofold. First, we wanted to compare the results of measurements with heterochromatic modulation of red and green lights with those using L- and M-cone isolating stimuli in a previous study with similar stimulus parameters (Jacob et al., 2015). Second, we wanted to study the dependency of the responses, particularly those reflecting activity of cone opponent mechanisms, on the

size of circular stimuli in more detail by including smaller stimuli than used with the cone isolating stimuli. In this range of stimuli, a dependency of response amplitude on stimulus size was expected.

Generally, the results presented here are in agreement with earlier studies (Jacob et al., 2015) showing that amplitudes, but not the phases, of the high-frequency ERGs strongly depend on stimulus diameter. There is also agreement in that the amplitude and stimulus diameter have a linear relationship in a double logarithmic plot (see Figure 6) with a slope between 1.1 and 1.6. Very similar slopes have been found by Jacob et al. (2015) for 36-Hz stimuli. This slope is substantially more shallow than the slope that is expected for a completely homogeneous retinal mechanism. The data therefore indicate that the retinal periphery contributes less to the ERG amplitude than the central retina.

Jacob et al. (2015) found that the L:M ratio in high-frequency responses is much larger with FF than with smaller stimuli, indicating that the responses that originate in the periphery are strongly L-cone dominated. This is confirmed in other ERG recordings (Challa et al., 2010; Kuchenbecker, Sahay, Tait, Neitz, & Neitz, 2008; Tsai et al., 2016) and messenger ribonucleic acid analyses (Hagstrom, Neitz, & Neitz, 1997, 2000). The L:M ratio determines the stimulus conditions for isoluminance: The larger the L:M ratio, the smaller the values for F_R at isoluminance (because less red modulation is needed to counteract the response to the green light). Therefore, a shift of the isoluminance conditions was expected from small values at FF to larger values with smaller stimuli. This, however, was not obvious from our data. However, the model fits show a tendency for the L-response fraction, and thus the L:M ratio, to decrease when stimulus size was decreased from FF to 70°. The reason why we do not have stronger correlations between isoluminance and stimulus size is unclear. Possibly, the different

Figure 3. Group-averaged (and standard deviation) F_R response amplitudes (left; logarithmic scale) and phases (right) to 36-Hz stimulation for the different stimulus sizes (color coded as in Figure 2).

Figure 4. Response amplitudes (left plots) and phases (right plots) as a function of F_R with 12-Hz stimulation for each observer (S1–S5). The plots are color coded for the different stimulus sizes used (see legend).

Figure 5. Group averaged (and standard deviation) amplitude (left) and phase (right) responses at 12 Hz as a function of F_R . Data recorded using different stimulus sizes are color coded as in Figure 4.

mean chromaticity in the present study is an explanation for this.

The present 12-Hz data and the results of Jacob et al. (2015) also agree in that for stimuli larger than 10° in diameter, the response amplitudes and phases are relatively invariant. Our data further provide evidence for the notion that these responses reflect cone opponent processes. However, we find small but consistent amplitude and phase decreases for increasing values of F_R (see Figure 5). We interpret this trend as an indication of intrusion of rod and possibly S-cone driven responses. These are not silenced in the present experiments as with the L- and M-cone isolating stimuli used by Jacob et al. (2015). We calculated that the silent substitution conditions for rods and the S-cones are both reached for F_R values between 0.9 and 1.0, thereby providing a possible explanation for an approximately monotonous relationship between amplitude and phase on the one hand and F_R on the other hand. Further evidence for this notion comes from the finding that the trend is not visible for FF stimuli, in which rods are completely desensitized (whereas with spatially restricted stimuli, rods in parts of the retina that are dark adapted may be stimulated by stray light; Aher and Kremers [2016]). The trend is neither visible for small stimuli with 2.5° , which possibly mainly stimulates retinal areas free of rods and S-cones.

Our 12-Hz data complements previous findings in that the responses were also recorded for smaller stimuli ($<10^\circ$ in diameter). Not surprisingly, the invariance of the response amplitude for different stimulus sizes could not be pushed to very small stimulus sizes approaching a diameter of 0° . We found instead that the response amplitudes depended on stimulus size for stimuli smaller than 10° (Figure 6). It was, however, still surprising that 12-Hz responses

Figure 6. Double logarithmic plots of response amplitudes as a function of stimulus diameter at 36-Hz (upper plot) and 12-Hz (lower plot) temporal frequencies, plotted separately for three values of F_R . For the 36-Hz data, the minimal amplitudes are also plotted. These occur at slightly different values of F_R . The linear regressions show positive correlations between response amplitude and stimulus size at 36 Hz and for stimuli smaller than 10° at 12 Hz.

Figure 7. Averaged phases of 36-Hz (upper plot) and 12-Hz (lower plot) responses at stimulus conditions with F_R equal to 0.0, 0.5, and 1.0 versus stimulus size. The phases at 36 Hz are relatively constant for the different stimulus sizes, whereas at 12 Hz the phases decrease for stimuli smaller than 30° .

could still be obtained with a 2.5° diameter stimuli. The 36-Hz responses were hardly measurable with 10° diameter stimuli (i.e., with a stimulus that has an area that was a factor of 16 larger). This finding is even more surprising because the signal-to-noise ratio is generally substantially smaller for 12-Hz stimulation (Kremers & Pageni, 2012).

In contrast, stimuli larger than 10° in diameter elicited responses with similar amplitudes. This finding can be interpreted as that the 12-Hz (putative cone opponent) ERG mechanism strongly saturates for large stimuli and might indicate that this mechanism is restricted to the central retina. However, previous data (Jacob et al., 2015) showed that similar response amplitudes can also be obtained with annular stimuli, in which the central retina was not stimulated. Even with annular stimuli with a 70° outer diameter and 60° inner diameter, large 12-Hz responses were found. This argues against the possibility that the generating chromatic mechanism is restricted to the central retina.

The area of this stimulus equals the area of a circular stimulus with about 36° diameter. Thus, a saturating mechanism may still explain the large response with annular stimuli, even if the stimuli are not restricted to the central retina.

Another surprising feature of the 12-Hz responses with small stimuli was that their phases strongly changed with stimulus size. A stimulus size dependent phase change was not observed for larger stimuli at 12 Hz. The origin of the phase change is still unclear. However, this finding is another indication of how the retinal circuitries that generate the 12-Hz ERGs are fundamentally different from those on which the 36-Hz responses are based.

Conclusions

Heterochromatic modulation ERGs reveal different mechanisms: (a) a high-frequency mechanism that putatively reflects a luminance driven response, the amplitude of which depends on the stimulus size, and (b) a 12-Hz mechanism that displays constant responses for stimuli larger than 10° in diameter, but the amplitudes and the phases strongly depend on stimulus size for stimuli smaller than 10° .

Keywords: electroretinography, magnocellular, parvocellular, stimulus size, temporal frequency

Acknowledgments

JK was supported by German Research Council (DFG) grant Kr1317/13-1 and German Ministry of Education and Research (BMBF) grant 01DN14009; MTSB was supported by FAPESP grant 2007/55125-1 and CNPq grant 470785/2014-4. BVN was supported by FAPESP 2014/06457-5; DFV was supported by FAPESP grant 2012/01115-3 and CNPq grant 490428/2013-4.

Commercial relationships: none.

Corresponding author: Jan Kremers.

Email: jan.kremers@uk-erlangen.de.

Address: Department of Ophthalmology, University Hospital Erlangen, Erlangen, Germany.

References

Aher, A., & Kremers, J. (2016). Rod versus cone driven ERGs at different stimulus sizes. Unpublished work.

- Armington, J. C. (1974). *The Electroretinogram*. New York: Academic Press.
- Barboni, M. T., Pageni, 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. [PubMed] [Article]
- Barboni, M. T., 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.
- Challa, N. K., McKeefry, D., Parry, N. R. A., Kremers, J., Murray, I. J., & Panorgias, A. (2010). L- and M-cone input to 12Hz and 30Hz flicker ERGs across the human retina. *Ophthalmic and Physiological Optics*, 30, 503–510.
- Dacey, D. M. (2000). Parallel pathways for spectral coding in primate retina. *Annual Review of Neuroscience*, 23, 743–775.
- Gouras, P., & Zrenner, E. (1979). Enhancement of luminance flicker by color-opponent mechanisms. *Science*, 205, 587–589.
- Hagstrom, S. A., Neitz, J., & Neitz, M. (1997). Ratio of M/L pigment gene expression decreases with retinal eccentricity. In C. R. Cavonius (Ed.), *Colour vision deficiencies XIII* (pp. 59–65). Dordrecht, the Netherlands: Kluwer.
- Hagstrom, S. A., Neitz, M., & Neitz, J. (2000). Cone pigment gene expression in individual photoreceptors and the chromatic topography of the retina. *Journal of the Optical Society of America A: Optics, Image Science, and Vision*, 17, 527–537.
- Huchzermeyer, C., Schlomberg, J., Welge-Lussen, U., Berendschot, T. T., Pokorny, J., & Kremers, J. (2014). Macular pigment optical density measured by heterochromatic modulation photometry. *PLoS One*, 9(10), e110521.
- Jacob, M. M., Pageni, G., Gomes, B. D., Souza, G. S., da Silva Filho, M., Silveira, L. C. L., . . . Kremers, J. (2015). The spatial properties of L- and M-cone inputs to electroretinograms that reflect different types of post-receptoral processing. *PLoS One*, 10(3), e0121218.
- Jacobs, G. H., & Deegan, J. F., II. (1997). Spectral sensitivity of macaque monkeys measured with ERG flicker photometry. *Visual Neuroscience*, 14, 921–928.
- Jacobs, G. H., & Neitz, J. (1993). Electrophysiological estimates of individual variation in the L/M cone ratio. In B. Drum (Ed.), *Colour vision deficiencies XI* (pp. 107–112). Dordrecht, the Netherlands: Kluwer.
- Jacobs, G. H., Neitz, J., & Krogh, K. (1996). Electroretinogram flicker photometry and its applications. *Journal of the Optical Society of America A*, 13, 641–648.
- Kaplan, E., Lee, B. B., & Shapley, R. M. (1990). New views of primate retinal function. *Progress in Retinal Research*, 9, 273–336.
- Kondo, M., & Sieving, P. A. (2001). Primate photopic sine-wave flicker ERG: Vector modeling analysis of component origins using glutamate analogs. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 42, 305–312. [PubMed] [Article]
- Kremers, J., & Link, B. (2008). Electroretinographic responses that may reflect activity of parvo- and magnocellular post-receptoral visual pathways. *Journal of Vision*, 8(15):11, 1–14, doi:10.1167/8.15.11. [PubMed] [Article]
- Kremers, J., & Pageni, G. (2012). Electroretinographic responses to photoreceptor specific sine wave modulation. *Journal of the Optical Society of America A*, 29, A309–A316.
- Kremers, J., Rodrigues, A. R., Silveira, L. C. L., & da Silva-Filho, M. (2010). Flicker ERGs representing chromaticity and luminance signals. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51, 577–587. [PubMed] [Article]
- Kremers, J., Usui, T., Scholl, H. P. N., & Sharpe, L. T. (1999). Cone signal contributions to electroretinograms in dichromats and trichromats. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 40, 920–930. [PubMed] [Article]
- Kuchenbecker, J. A., Sahay, M., Tait, D. M., Neitz, M., & Neitz, J. (2008). Topography of the long- to middle-wavelength sensitive cone ratio in the human retina assessed with a wide-field color multifocal electroretinogram. *Visual Neuroscience*, 25, 301–306.
- Lee, B. B., Martin, P. R., & Grunert, U. (2010). Retinal connectivity and primate vision. *Progress in Retinal and Eye Research*, 29, 622–639.
- McAnany, J. J., Park, J. C., & Cao, D. (2015). Rod- and cone-isolated flicker electroretinograms and their response summation characteristics. *Visual Neuroscience*, 32, E018.
- Park, J. C., Cao, D., Collison, F. T., Fishman, G. A., & McAnany, J. J. (2015). Rod and cone contributions to the dark-adapted 15-Hz flicker electroretinogram. *Documenta Ophthalmologica*, 130, 111–119.
- Parry, N. R., Murray, I. J., Panorgias, A., McKeefry, D. J., Lee, B. B., & Kremers, J. (2012). Simultaneous chromatic and luminance human electroretinogram responses. *Journal of Physiology*, 590, 3141–3154.

- Pokorny, J., Smith, V. C., & Lutze, M. (1989). Heterochromatic modulation photometry. *Journal of the Optical Society of America A*, 6, 1618–1623.
- Tsai, T. I., Jacob, M. M., McKeefry, D., Murray, I. J., Parry, N. R. A., & Kremers, J. (2016). Spatial properties of L- and M-cone driven incremental (on-) and decremental (off-) electroretinograms: Evidence for the involvement of multiple post-receptoral mechanisms. *Journal of the Optical Society of America A*, 33, A1–A11.

ANEXO 2 - Dystrophin Is Required for Proper Functioning of Luminance and Red–Green Cone Opponent Mechanisms in the Human Retina.

Artigo publicado em *Investigative Ophthalmology & Visual Science* (2016) 57 (8), 3581-3587.

Dystrophin Is Required for Proper Functioning of Luminance and Red–Green Cone Opponent Mechanisms in the Human Retina

Mirella Telles Salgueiro Barboni,^{1,2} Cristiane Maria Gomes Martins,^{1,2} Balázs Vince Nagy,^{1,2} Tina Tsai,³ Francisco Max Damico,^{1,2,4} Marcelo Fernandes da Costa,^{1,2} Rita de Cassia M. Pavanello,⁵ Naila Cristina Vilaça Lourenço,⁵ Antonia Maria Pereirade Cerqueira,⁵ Mayana Zatz,⁵ Jan Kremers,³ and Dora Fix Ventura^{1,2}

¹Núcleo de Neurociências e Comportamento, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

²Departamento de Psicologia Experimental, Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

³Department of Ophthalmology, University Hospital Erlangen, Erlangen, Germany

⁴Departamento de Oftalmologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

⁵Centro de Pesquisas do Genoma Humano e Células-Tronco Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

Correspondence: Mirella Telles Salgueiro Barboni, Av. Prof. Mello Moraes, 1721, Bloco D, Sala 206, 05508-030 São Paulo, SP, Brazil; mirellabarboni@usp.br.

Submitted: February 3, 2016

Accepted: May 27, 2016

Citation: Barboni MTS, Martins CMG, Nagy BV, et al. Dystrophin is required for proper functioning of luminance and red–green cone opponent mechanisms in the human retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2016;57:3581–3587. DOI:10.1167/iovs.16-19287

PURPOSE. Visual information is processed in parallel pathways in the visual system. Parallel processing begins at the synapse between the photoreceptors and their postreceptoral neurons in the human retina. The integrity of this first neural connection is vital for normal visual processing downstream. Of the numerous elements necessary for proper functioning of this synaptic contact, dystrophin proteins in the eye play an important role. Deficiency of muscle dystrophin causes Duchenne muscular dystrophy (DMD), an X-linked disease that affects muscle function and leads to decreased life expectancy. In DMD patients, postreceptoral retinal mechanisms underlying scotopic and photopic vision and ON- and OFF-pathway responses are also altered.

METHODS. In this study, we recorded the electroretinogram (ERG) while preferentially activating the (red–green) opponent or the luminance pathway, and compared data from healthy participants ($n = 16$) with those of DMD patients ($n = 10$). The stimuli were heterochromatic sinusoidal modulations at a mean luminance of 200 cd/m². The recordings allowed us also to analyze ON and OFF cone-driven retinal responses.

RESULTS. We found significant differences in 12-Hz response amplitudes and phases between controls and DMD patients, with conditions with large luminance content resulting in larger response amplitudes in DMD patients compared to controls, whereas responses of DMD patients were smaller when pure chromatic modulation was given.

CONCLUSIONS. The results suggest that dystrophin is required for the proper function of luminance and red–green cone opponent mechanisms in the human retina.

Keywords: retina, electroretinography, magnocellular/parvocellular, Duchenne muscular dystrophy, dystrophin

Dystrophin is a large protein^{1,2} responsible for connecting intra- and extracellular protein complexes.³ The gene responsible for its transcription (*DMD*) is located at Xp21 on the short arm of the X chromosome. It has seven promoters, three of which are responsible for the transcription of the full-length dystrophin (Dp427), while the other four are needed for the intragenic transcriptions of smaller gene products: Dp260, Dp140, Dp116, and Dp71. Nonsense mutations in the *DMD* gene cause Duchenne muscular dystrophy (DMD), an X-linked lethal disorder that affects 1 among 3500 to 5000 males.^{4–9} The severity of the symptoms in DMD, however, varies depending on the location of the mutation(s).

Nonsense mutations in the full-length dystrophin (Dp427) result in a decreased life expectancy,¹⁰ progressive muscle degeneration and weakness,¹ impaired cognitive performance,¹¹ and altered retinal physiology.¹² Additional dysfunction

of smaller gene products may lead to increased cognitive deficits^{13–15} and/or abnormal retinal physiology.^{16–20}

The first reports on altered retinal activity in DMD patients with a detectable deletion in the *DMD* gene showed a reduction or an absence of the scotopic b-wave.^{17,18} It has also been reported that, in addition to rod-driven signals, photopic responses in the ON pathway were abnormal in DMD patients.¹⁹ More recently, we showed an abnormal photopic retinal ON activity in DMD patients with genetic mutations in both the full Dp427 protein and smaller gene products, including Dp260.¹⁶

In this study, we investigated the physiology of the retina with electroretinography (ERG) in response to heterochromatic stimulation at two different temporal frequencies. Stimulation at 12 Hz in ERG is thought to mainly reflect red–green opponency when both red and green are modulated in

TABLE 1. Characteristics of the DMD Patients

N	Age	Cort	Mutation	Affected Dystrophin Isoforms
1	15	9	51-52	Dp427 / Dp260 / Dp140
2	16	7	46-47	Dp427 / Dp260 / Dp140
3	29	13	46-55	Dp427 / Dp260 / Dp140
4	14	9	55	Dp427 / Dp260 / Dp140
5	16	4	48-52	Dp427 / Dp260 / Dp140
6	24	18	43-45	Dp427 / Dp260 / Dp140
7	18	10	44-47	Dp427 / Dp260 / Dp140
8	17	10	3-7	Dp427
9	18	9	3-7	Dp427
10	12	5	3-15	Dp427
Ave	18	9		
SD	5	4		

Cort, years of corticosteroid intake; mutation, mutated exons; ave, average; SD, standard deviation.

counterphase, which is related to processing in the parvocellular pathways. Heterochromatic (red-green) 36-Hz flicker ERGs is thought to reflect luminance processing related to the magnocellular pathway. In the patients, the responses to 12 Hz containing only isoluminant red-green stimulation are decreased, indicating that the red-green opponent channel is affected. On the other hand, stimulation containing both luminance and chromatic modulation led to increased responses in the patients, suggesting additional input from the luminance channel. We speculate that the previously reported imbalance between ON and OFF activities may underlie this altered function of the luminance channel.

METHODS

Subjects

The participants included 10 DMD patients (mean age 18 ± 5 years) and 16 controls (mean age 17 ± 7 years), all of whom were males. The inclusion criteria were best-corrected visual acuity of 20/30 or better, absence of ophthalmologic diseases, normal fundus, and absence of any other disease that could affect the visual system (as so informed by the patients or their relatives). Table 1 shows the mutated exons for all DMD patients. Seven DMD patients presented genetic alteration between exon 30 and exon 56, which affects *DMD* gene products Dp427, Dp260, and Dp140. Three DMD patients had mutations upstream of exon 30, affecting only Dp427. Table 1 also indicates the age and the period of corticosteroid intake for all patients prior to testing (mean = 9 ± 4 years).

The experiments adhered to the tenets of the Declaration of Helsinki and were approved by the institutional ethics committee (CEP-HU/USP 156.826). Signed informed consent was obtained from the subjects and, when applicable, from their parents after explanation of the nature and possible consequences of the study.

Genetic Screening

Duchenne muscular dystrophy mutations were screened through the MLPA reaction (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification), allowing the detection of deletion or duplication occurring in this gene. The reaction was performed according to the manufacturer's instructions (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) and the resulting products were separated by capillary electrophoresis.

Analyses were done by the Human Genome and Stem Cell Research Center from the Institute of Biosciences using the GeneMarker software (www.mpl.com).

ERG Recordings

After the ophthalmologic examination, one eye was dilated with a drop of mydriaticum (0.5% tropicamide). Corneal ERG responses were acquired using a Dawson, Trick, Litzkow (DTL) fiber electrode attached at the outer to inner canthus of the eye. The reference and ground skin electrodes were attached to the ipsilateral temple and forehead, respectively. Signals were amplified 100,000 $\times$, filtered between 1 and 300 Hz, and sampled at 1024 Hz using the Roland Consult (Brandenburg, Germany) RetiPort system. At least 20 episodes, each lasting 1 second, were averaged.

The stimuli and full protocol details have been described previously by Kremers, et al.²¹ Barboni, et al.^{22,23} described a short version of the protocol that was used in the present work. Briefly, a Ganzfeld stimulator (Q450 SC; Roland-Consult) with red (638 nm; full width at half maximum [FWHM] = 19 nm) and green (523 nm; FWHM = 36 nm) light-emitting diode (LED) arrays was used. The mean luminance of the red and green LED arrays was 100 cd/m², resulting in a mean retinal illuminance of approximately 10^4 photopic Td (assuming 8-mm pupil diameter) with a yellow mean chromaticity of $x = 0.5675$, $y = 0.4201$ (Commission Internationale de l'Eclairage [CIE] 1931 coordinates).

Heterochromatic stimuli were generated by counterphase modulation of the output of the red and green LEDs. The red and green modulation contrast was varied to generate three different red fractions: ($R / (R + G)$). At $R / (R + G) = 0$, only the green LEDs were modulated with 100% contrast, while the red LEDs were not modulated and had a constant output of 100 cd/m². At the $R / (R + G) = 0.5$ condition, the red and green LEDs were modulated in counterphase with 50% contrast. At the $R / (R + G) = 1$ condition, only the red LEDs were modulated with 100% contrast; the output of the green LEDs was constant at 100 cd/m².

Figure 1B shows the modulation of the LEDs for each of the three conditions. Figure 1 also shows the resulting theoretical chromatic modulation (Fig. 1A) and the luminance modulation (Fig. 1C). When $R / (R + G) = 0$ or 1, the luminance modulation is large and of equal amplitude. At $R / (R + G) = 0.5$ there is no luminance output. The luminance modulation followed the green LEDs at $R / (R + G) = 0$ and the red LEDs at $R / (R + G) = 1$, resulting in a shift of the phase of the luminance modulation by 180° (Fig. 1E). The amplitude and the phase of the cone opponent system's estimated output was the same for all values of $R / (R + G)$ (Fig. 1D) because the chromatic modulation was equal in all three conditions.

Measurements were repeated at two temporal frequencies: 12 and 36 Hz. The time-averaged luminance and chromaticity were constant for all stimuli, indicating that the state of adaptation was constant (assuming that the 12- and 36-Hz stimulus frequencies are too high for adaptation processes). S-cone input is assumed to be negligible, and the total mean luminance of 200 cd/m² is assumed to be too high for substantial rod input.²¹ The full-field stimulation avoids stray light that can stimulate the rods in dark-adapted parts of the retina (Aher, Kremers, unpublished data, 2016).

We also performed ERG recordings to luminance ON and OFF stimulation using protocols described previously.¹⁶ Briefly, a white LED array (chromaticity of $x = 0.3116$, $y = 0.3277$; CIE 1931 coordinates) was used to generate 4-Hz flicker rapid-ON sawtooth or rapid-OFF sawtooth stimulation at 100% contrast, with a mean luminance of 60 cd/m².

FIGURE 1. Modulation of the LEDs for each of the three conditions: 0.0, 0.5, and 1.0 (**B**). Chromatic (**A**) and luminance (**C**) stimulations. Estimated amplitude (*upper graphs*) and phase (*lower graphs*) responses for the cone opponent (**D**) and luminance (**E**) outputs.

Data Analyses

The recordings were Fourier analyzed using self-written software (MATLAB; The MathWorks, Natick, MA, USA). Noise was quantified by the average of the response amplitudes of the 11- and 13-Hz components and 35- and 37-Hz components for the 12- and 36-Hz stimulus conditions, respectively. Phase values were disregarded when the signal-to-noise ratio was less than 3. The definition of signal-to-noise ratio was based on the methods and statistics introduced by Meigen and Bach,²⁴ which exclusively analyze amplitude data. Amplitudes (in microvolts) and phases (in degrees) of the first (fundamental) and second harmonic were statistically compared between controls and DMD patients.

In order to discover statistical differences within the different parameter settings, we have built a general linear model (GLM) to test the null hypothesis that all three test conditions (0.0, 0.5, 1.0) have equal results for both controls and DMD patients. A total of eight comparison GLMs were performed analyzing the first and second harmonic amplitudes

and phases at the two test frequencies. In statistically significant cases, pairwise comparisons were applied with the Mann-Whitney *U* test. Spearman's rank correlation was used to verify the effect of age and corticosteroid intake on the ERG and to compare ON/OFF amplitude of the heterochromatic flicker ERGs ratios with the first harmonic amplitudes. A *P* value less than 0.05 was defined to indicate a significant difference.

RESULTS

Representative recordings at 12 Hz (upper) and 36 Hz (lower) for all stimulus conditions are shown in Figure 2. At 12 Hz, the control subject (black) displayed similar response amplitudes and phases at the three conditions. The DMD patient (gray) showed higher amplitudes at *R / (R + G)* 0 and 1 in comparison with the 0.5 condition. Furthermore, the response phases in extremes were approximately 180° apart. At 36 Hz, the responses measured at conditions 0 and 1 were large and

FIGURE 2. Individual recordings of representative subjects (black, a representative control; gray, a representative DMD patient) at 12 Hz (upper signals) and 36 Hz (lower signals). The scale and units are provided on the right side. A dotted line shows phase differences between the DMD patient and the control in condition $R / (R + G) = 0.0$ at 12 Hz.

approximately in counterphase relative to each other for the control and for the DMD patient. The response amplitudes at condition 0.5 were small.

Figure 3 shows the ERG amplitudes (upper plots) and phases (lower plots) at 12 Hz (left graphs) and at 36 Hz (right graphs). Solid and dotted lines connect the averages of control and DMD data, respectively. The gray dots represent the results of seven DMD patients with mutations at locations downstream to exon 30 and thus affecting Dp427, Dp260, and Dp140 (patients 1–7 in Table 1). The red dots are individual results of the three DMD patients with genetic mutations upstream of exon 30, who are deficient only in Dp427 (patients 8, 9, and 10 in Table 1). At 36 Hz, results from only

two (of the three) DMD patients with genetic mutations upstream exon 30 are shown, due to poor responses from the third patient.

Table 2 shows averages and standard deviations at 12 and 36 Hz as well as the P values resulting from the GLM comparison between patient and control subject data. The GLM results, corrected for multiple comparison (Holm method) of the eight tests, showed statistically significant differences ($P < 0.05$) in only two conditions (12-Hz first harmonic amplitude and phase; $P \ll 0.05$ and $P \ll 0.05$, respectively). In order to discover differences between control and DMD within the different conditions, we applied pairwise statistical comparisons for each 12-Hz first harmonic amplitude and phase

FIGURE 3. ERG results at 12 Hz (left graphs) and at 36 Hz (right graphs) for amplitude (upper graphs) and phase (lower graphs) responses. Black dots represent the average $\pm$ one standard deviation of the control group ($N = 16$). The gray dots are individual results of seven DMD patients downstream exon 30. The drawn line connects the averaged data of the control subjects; dotted line connects the averaged results of the DMD patients with mutation downstream of exon 30. The red dots are individual data of DMD patients with upstream 30 mutations. There were significant differences for all parameters at 12 Hz, while the results at 36 Hz were similar between controls and patients. All P values are provided in Table 2.

TABLE 2. Summary of ERG Parameters, Average $\pm$ Standard Deviation, and *P* Values of the GLM Comparisons at 12 Hz

First Harmonic	12 Hz			36 Hz		
Amplitude, μ V	0.0	0.5	1.0	0.0	0.5	1.0
Control, $n = 16$	2.7 ± 2	3.5 ± 2	5.3 ± 2	11.5 ± 5	3.7 ± 2	19.6 ± 7
DMD downstream 30, $n = 7$	5.3 ± 2	1.9 ± 0.6	8.6 ± 2	11.8 ± 3	3.3 ± 2	17.6 ± 5
<i>P</i> value	0.020	0.016	0.027			
Phase, $^{\circ}$	0.0	0.5	1.0	0.0	0.5	1.0
Control, $n = 16$	305 ± 83	324 ± 20	308 ± 40	320 ± 12	131 ± 24	127 ± 20
DMD downstream 30, $n = 7$	70 ± 13	291 ± 29	258 ± 10	303 ± 12	111 ± 29	108 ± 24
<i>P</i> value	0.001	0.020	0.005			

condition using the Mann-Whitney *U* test. The resulting six pairwise comparisons are shown in Table 2 with their respective *P* values corrected for multiple comparisons with the Holm method. All pairwise comparisons were statistically significant.

We did not find statistically significant correlation between the ERG results (response amplitudes and phases at all conditions) and age of the subjects (control subjects: $P > 0.05$ and $|R^2| < 0.57$; DMD patients: $P > 0.05$ and $|R^2| < 0.8$) or the duration of corticoid treatment in DMD patients ($P > 0.05$ and $|R^2| < 0.63$).

At 12 Hz, the response amplitudes and phases in the control group were relatively constant for the three conditions (Fig. 3 left, drawn line), indicating that the chromatic content in the stimulus determined the responses (Fig. 1D). However, the response amplitudes and phases measured in the patients depended strongly on $R / (R + G)$ in the stimulus. The amplitudes at $R / (R + G) = 0$ and 1 were larger than the controls for the DMD patients with downstream 30 genetic defects. On the other hand, these patients had lower amplitudes for $R / (R + G) = 0.5$, revealing a V-shaped

response amplitude profile. In addition, their response phases were also changed, showing a phase shift of approximately 180° between conditions 0.0 and 1.0. One DMD upstream exon 30 patient exhibited the same response characteristics as those observed in the downstream 30 patients. Data from the other two were more intermediate between those of the control subjects and the patients with downstream exon 30 mutations.

At 36 Hz, the responses were similar in controls and DMD patients. Response amplitudes as a function of chromatic content displayed a V shape: Amplitudes at $R / (R + G) = 0.0$ and 1.0 are larger than those obtained at $R / (R + G) = 0.5$. The responses were approximately 180° phase shifted at conditions 0 and 1.

Figure 4 shows the response amplitudes for the extreme conditions [$R / (R + G) = 0$ (left graph) and $R / (R + G) = 1$ (right graph)] as a function of the ratio between b- and d-wave amplitudes of the ON and OFF responses, respectively (see the lower part of Figure 4 for traces of the ON and OFF components considered to calculate the ratio). The ratio was used to quantify the ON/OFF asymmetry. There is a negative

FIGURE 4. Correlation between the HFP amplitudes at 12 Hz for condition $R / (R + G) = 0$ (left graph) and $R / (R + G) = 1$ (right graph) and the ON/OFF response ratio. The ratio was calculated by dividing the amplitude of the b-wave obtained from recording luminance rapid-ON sawtooth ERG by the amplitude of the d-wave obtained from recording luminance rapid-OFF sawtooth ERG. Examples of the responses used for this calculation are shown in the lower part of the figure (typical control ON and OFF responses and typical DMD ON and OFF responses). A negative correlation between the ON/OFF response amplitude ratios and the response amplitudes to 12-Hz HFP stimuli is apparent: $R / (R + G) = 0$ ($P = 0.001$ and $R^2 = -0.67$) and $R / (R + G) = 1$ ($P = 0.0001$ and $R^2 = -0.69$).

correlation between the two conditions: $R / (R + G) = 0$ ($P = 0.001$) or $R / (R + G) = 1$ ($P = 0.0001$), but not for the $R / (R + G) = 0.5$ condition (data not shown).

DISCUSSION

The ERG responses of DMD patients to 12-Hz red-green counterphase sine wave modulation differed from those of healthy control subjects. In the control group, these responses followed the chromatic content of the stimulus (see Fig. 1D); therefore amplitude and phase responses were relatively constant and independent of the red-to-green ratio of the stimulus. For conditions with large luminance content, response amplitudes of DMD patients (particularly with mutations downstream of exon 30) were larger than those of the controls, whereas responses of DMD patients were smaller than those of the controls where pure chromatic modulation was given. Moreover, their response phases were also not as constant as in controls. The response phases of DMD patients for conditions with large luminance contents [$R / (R + G) = 0.0$ and 1.0] were shifted by approximately 180° relative to each other (Fig. 3, left lower graph). This response profile was found for the controls at 36 Hz, where the responses are determined by the luminance modulation of the stimulus (see Fig. 1E). At 36 Hz, controls and DMD patients showed similar response properties.

The second harmonic amplitudes and phases were similar between controls and DMD patients at 12 and 36 Hz (data not shown). We previously proposed that the responses to 12-Hz luminance stimuli are, to a large extent, determined by a nonlinear interaction between two response mechanisms (called “sine-like” and “transient”; Pageni et al.²⁵). This would explain the large second harmonic component in the response. The unaltered presence of a second harmonic component in the DMD patients indicates that this interaction was not changed by the mutation of the *DMD* gene.

It has been reported earlier by our group that these ERG protocols probably reflect indirectly the activity of the red-green cone opponent (parvocellular or P) pathway at 12 Hz, and of the luminance (magnocellular or M) pathway at 36 Hz in healthy subjects.^{21–23} Since at both 12 and 36 Hz there are relatively small response amplitudes in condition $R / (R + G) = 0.5$, we assume that the phase difference between the green and the red stimulation might cancel out when the signals are recorded. Moreover at 12 Hz, the frequency at which the chromatic mechanism is driving the first harmonic responses, this cancellation appears independent of the ratio between the red and the green modulation. Although the ERGs do not reflect direct activity in the P and M pathways, the present results suggest that midget and diffuse bipolar cells are differently affected in DMD patients.

We propose two distinct significant effects of dystrophin deficiency on the responses to 12-Hz heterochromatic modulation. One is a diminished response when the luminance content in the stimulus was small [i.e., for $R / (R + G)$ equals 0.5]. These findings support the notion that dystrophin is required for the proper function of the red-green cone opponent mechanism (related to the parvocellular pathway) in the human retina and might explain the presence of red-green color vision deficiencies in DMD patients.^{26,27}

Another is an augmented effect, as responses in DMD patients were larger to 12-Hz stimuli with large luminance content [i.e., when $R / (R + G)$ equals 0 or 1]. Though surprising, this could possibly be explained by a decreased destructive interaction between ON and OFF responses at this temporal frequency. To elaborate, previous reports^{28–30} revealed that ON and OFF responses have about the same amplitude at 12 Hz under normal circumstances, but are 180°

apart in phase. As a result, ON and OFF responses in control subjects may have cancelled each other out, resulting in a small total response to 12-Hz luminance modulation. An alternative explanation is that the luminance responses show a prominent second harmonic response at this frequency. We therefore suggested previously²⁵ that the minimum at 12 Hz is a result of a nonlinear interaction of two mechanisms that lead to a frequency doubled response at 12 Hz. Such a frequency doubled response was observed only in condition $R / (R + G) = 1.0$ at 12 Hz, indicating that the nonlinear interaction is more important when there is the red modulation. Dystrophin seems to disturb the synchronization of the red and green signals when a chromatic opponent mechanism is driving the response in the human retina. The evidence of an asymmetric defect of the ON ERG responses in DMD patients gives rise to the hypothesis that the increase in the amplitudes at 12 Hz in conditions $R / (R + G) = 0.0$ and $R / (R + G) = 1.0$ would be the result of this phase change that would not cancel red and green signals as observed in the controls.

Pillars et al.¹² showed that DMD gene products are present in the outer plexiform layer of the human retina. Although the function that dystrophins have there is unclear, they may play a role in the structural connection between photoreceptors and ON-bipolar cells,³¹ given its presence in their invaginating contacts in the mouse retina.^{32,33} In line with this, ON-luminance responses were found to be more affected than OFF responses in DMD patients.^{16,19} We propose, therefore, that the imbalance of ON versus OFF responses in DMD patients may explain the larger 12-Hz luminance responses, as the ON and OFF responses would not cancel each other out. If this were true, it can be expected that there is a correlation between the amplitude ratios of the ON versus OFF responses and the amplitudes of the 12-Hz luminance responses in the present study.

We were able to test this hypothesis since the subjects who participated in the current study also underwent ERG recordings to luminance ON and OFF stimulation using protocols described previously.¹⁶ In line with our hypothesis, there is a significant negative correlation between the ON/OFF asymmetric amplitudes with amplitudes of 12-Hz extreme conditions, but not for the intermediate condition.

In conclusion, our data show that dystrophin deficiency in the human retina leads to an increase in the ERG responses to 12-Hz luminance stimuli, probably caused by an imbalance between ON and OFF activity. In addition, changes in the activity of the postreceptoral chromatic mechanism are apparent. The number of subjects tested is a limitation of the study (seven DMD patients with genetic alteration downstream exon 30 and three DMD patients with genetic alteration upstream 30). Future studies are needed to provide additional information about the role that Dp427 and the subproducts of the *DMD* gene play in the human retinal electrophysiology. In addition, ERG measurements using white flicker at the frequencies used in our study will enable analysis of whether the alterations found in the present report are due to the heterochromatic content of the stimuli or determined by the frequency of the stimulation.

Acknowledgments

Supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, (CNPq) 470785/2014-4 (MTSB); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) 2014/06457-5 (BVN); FAPESP 2012/01115-3 and 2014/26818-2, FAPESP-Bayerische Hochschulzentrum für Lateinamerika (BAYLAT) 2012/51299-3, CNPq 490428/2013-4, and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) 3263/2013 (DVF); FAPESP-Centro de Pesquisa, Inovação e Difusão (CEPID) 2013/08028-1,

CNPq 705019/2009, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) 2008/578997 (MZ), Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) (German Research Foundation) Grant KR1317/13-1 and Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) Grant 01DN14009 (JK). DfV and MZ are CNPq 1A Research Fellows.

Disclosure: **M.T.S. Barboni**, None; **C.M.G. Martins**, None; **B.V. Nagy**, None; **T. Tsai**, None; **F.M. Damico**, None; **M.F. da Costa**, None; **R.d.C.M. Pavanello**, None; **N.C.V. Lourenço**, None; **A.M.P. de Cerqueira**, None; **M. Zatz**, None; **J. Kremers**, None; **D.F. Ventura**, None

References

- Hoffman EP, Brown RH Jr, Kunkel LM. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*. 1987;51:919-928.
- Hoffman EP, Fischbeck KH, Brown RH, et al. Characterization of dystrophin in muscle-biopsy specimens from patients with Duchenne's or Becker's muscular dystrophy. *N Engl J Med*. 1988;318:1363-1368.
- O'Brien KE, Kunkel LM. Dystrophin and muscular dystrophy: past, present, and future. *Mol Genet Metab*. 2001;74:75-88.
- Zatz M, Vianna-Morgante AM, Campos P, Diamant AJ. Translocation (X;6) in a female with Duchenne muscular dystrophy: implications for the localisation of the DMD locus. *J Med Genet*. 1981;18:442-447.
- Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell*. 1987;50:509-517.
- Blake DJ, Kroger S. The neurobiology of duchenne muscular dystrophy: learning lessons from muscle? *Trends Neurosci*. 2000;23:92-99.
- Fortina P, Cheng J, Shoffner MA, et al. Diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy and quantitative identification of carrier status by use of entangled solution capillary electrophoresis. *Clin Chem*. 1997;43:745-751.
- Nobile C, Marchi J, Nigro V, Roberts RG, Danieli GA. Exon-intron organization of the human dystrophin gene. *Genomics*. 1997;45:421-424.
- Blake DJ, Weir A, Newey SE, Davies KE. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev*. 2002;82:291-329.
- Hauser MA, Chamberlain JS. Progress towards gene therapy for Duchenne muscular dystrophy. *J Endocrinol*. 1996;149:373-378.
- Mehler MF. Brain dystrophin, neurogenetics and mental retardation. *Brain Res Brain Res Rev*. 2000;32:277-307.
- Pillers DAM, Bulman DE, Weleber RG, et al. Dystrophin expression in the human retina is required for normal function as defined by electroretinography. *Nat Genet*. 1993;4:82-86.
- Gilberto F, Ferreira V, Dalamon V, Szijian I. Dystrophin deletions and cognitive impairment in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Neurol Res*. 2004;26:83-87.
- Bresolin N, Castelli E, Comi GP, et al. Cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*. 1994;4:359-369.
- Moizard MP, Billard C, Toutain A, Berret F, Marmin N, Moraine C. Are Dp71 and Dp140 brain dystrophin isoforms related to cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy? *Am J Med Genet*. 1998;80:32-41.
- Barboni MTS, Nagy BV, Moura ALD, et al. ON and OFF electroretinography and contrast sensitivity in Duchenne muscular dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54:3195-3204.
- Cibis GW, Fitzgerald KM, Harris DJ, Rothberg PG, Rupani M. The effects of dystrophin gene mutations on the ERG in mice and humans. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1993;34:3646-3652.
- Debecker I, Riddell DC, Dooley JM, Tremblay F. Correlation between electroretinogram findings and molecular analysis in the Duchenne muscular dystrophy phenotype. *Br J Ophthalmol*. 1994;78:719-722.
- Fitzgerald KM, Cibis GW, Giambrone SA, Harris DJ. Retinal signal transmission in Duchenne muscular dystrophy: evidence for dysfunction in the photoreceptor depolarizing bipolar cell pathway. *J Clin Invest*. 1994;93:2425-2430.
- Sigismund DA, Weleber RG, Pillers DAM, et al. Characterization of the ocular phenotype of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Ophthalmology*. 1994;101:856-865.
- Kremers J, Rodrigues AR, Silveira LC, da Silva FM. Flicker ERGs representing chromaticity and luminance signals. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51:577-587.
- Barboni MT, Ventura DE, Kremers J. Absence of ocular interaction in flicker ERG responses reflecting cone opponent and luminance signals. *Doc Ophthalmol*. 2010;121:69-75.
- Barboni MTS, Pangeni G, Ventura DE, Horn F, Kremers J. Heterochromatic flicker electroretinograms reflecting luminance and cone opponent activity in glaucoma patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52:6757-6765.
- Meigen T, Bach M. On the statistical significance of electrophysiological steady-state responses. *Doc Ophthalmol*. 1999;98:207-232.
- Pangeni G, Horn FK, Kremers J. A new interpretation of components in the ERG signals to sine wave luminance stimuli at different temporal frequencies and contrasts. *Vis Neurosci*. 2010;27:79-90.
- Philip U, Smith CA, Walton JN. Colour blindness and the Duchenne-type muscular dystrophy. *Ann Hum Genet*. 1956;21:155-158.
- Costa MF, Oliveira AGF, Feitosa-Santana C, Zatz M, Ventura DE. Red-green color vision impairment in Duchenne muscular dystrophy. *Am J Hum Genet*. 2007;80:1064-1075.
- Kondo M, Sieving PA. Primate photopic sine-wave flicker ERG: vector modeling analysis of component origins using glutamate analogs. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42:305-312.
- Burns SA, Elsner AE, Kreitz MR. Analysis of nonlinearities in the flicker ERG. *Optom Vis Sci*. 1992;69:95-105.
- Odom JV, Reits D, Burgers N, Riemslag FC. Flicker electroretinograms: a systems analytic approach. *Optom Vis Sci*. 1992;69:106-116.
- Ueda H, Gohdo T, Ohno S. Beta-dystroglycan localization in the photoreceptor and Muller cells in the rat retina revealed by immunoelectron microscopy. *J Histochem Cytochem*. 1998;46:185-191.
- Ueda H, Kato Y, Baba T, et al. Immunocytochemical study of dystrophin localization in cone cells of mouse retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997;38:1627-1630.
- Ueda H, Baba T, Terada N, Kato Y, Tsukahara S, Ohno S. Dystrophin in rod spherules; submembranous dense regions facing bipolar cell processes. *Histochem Cell Biol*. 1997;108:243-248.

ANEXO 3 – Photoreceptor-specific light adaptation of Critical Flicker Frequency
in Trichromat and Dichromat Observers

Artigo para publicação

Photoreceptor-specific light adaptation of Critical Flicker Frequency in Trichromat and Dichromat Observers

Cord Huchzermeyer¹, Cristiane M G Martins^{1,2}, Balázs Nagy^{2,3}, Mirella TS Barboni², Dora F Ventura², Marcelo F Costa², Jan Kremers¹

1) Department of Ophthalmology, University Hospital Erlangen, Erlangen, Germany

2) Department of Experimental Psychology University of Sao Paulo -Sao Paulo, Brazil

3) Department of Mechatronics, Optics and Engineering Informatics, Faculty of Mechanical Engineering, Budapest University of Technology and Economics, Hungary

Corresponding author: Cord Huchzermeyer

Address:

Department of Ophthalmology
University Hospital Erlangen,
Schwabachanlage 6,
91054 Erlangen, Germany.

E-mail: Cord.Huchzermeyer@uk-erlangen.de

Telephone: +49-91318544711

Abstract

The silent substitution paradigm offers possibilities to investigate and compare the temporal properties, including the critical flicker frequency (CFF), of mechanisms that are driven by different photoreceptor types under identical states of adaptation. We have: (1) measured CFFs using triple silent substitutions to isolate L-, M- and S-cone as well as rod driven pathways under identical mean luminances and chromaticities; (2) repeated the CFF measurements at different mean luminances in order to validate the Ferry-Porter-law (stating that the relationship between CFF and the log retinal illuminance $\log I$ is linear) for these stimuli; and (3) compared these CFF vs. $\log I$ -functions for L-, M-, S-cone-, and rod-isolating stimuli for five trichromats and four X-linked dichromats (two protanopes, two deuteranopes). We show that the effects of luminance on the CFFs with silent substitution and chromatic stimuli are comparable. We further show that there is a (presumably postreceptoral) suppression of M-cone-driven CFFs in trichromats, resulting in smaller slopes of the M-cone driven CFF vs $\log I$ -functions compared with protanopes. This highlights the importance of postreceptoral interactions of L- and M-cone driven signals. The data also show the importance of control of adaptation in CFF measurements.

Keywords

Critical flicker frequency, Ferry-Porter law, Silent substitution, Dichromats, Postreceptoral interaction

Introduction

The ability to resolve temporal changes is an important aspect of vision. Temporal properties of the visual system can be characterized by measuring the highest frequency that can be resolved under a given condition: this is called the critical flicker frequency (CFF). Temporal aspects of vision are more completely described by the temporal contrast sensitivity function (tCSF), which shows temporal contrast sensitivity, that is the inverse of the Michelson contrast at threshold, as a function of frequency (1,2). The CFF corresponds to the high-frequency cutoff of the tCSF.

Critical flicker frequency is found to be linearly dependent on the logarithm of the retinal illuminance ($\log I$) under most mesopic and photopic conditions (this is the so-called Ferry-Porter law (3,4)). Furthermore, the CFF is also dependent on temporal contrast. The effects of $\log$ Michelson contrast and $\log$ retinal illuminance on CFFS were found to be identical provided the contrast was at least 20% (5) but it was also reported to hold for contrasts down to 5-10% (6), indicating that CFF is determined by the absolute amplitude of modulation rather than contrast. The Granit-Harper law states that CFF depends on stimulus size, where CFF increases with stimulus size, proportionally to the number of ganglion cells stimulated (7).

Furthermore, the slopes of the CFF- $\log I$ -functions depend on the chromaticity of the stimulus (although it should be mentioned that the stimuli do only contain isochromatic luminance modulation; see Fig. 1), and this has been thought to reflect different temporal properties of the photoreceptors that are most sensitive for a given stimulus (8–13). Especially, Hamer and Tyler (8) have claimed that CFF is determined independently by the most sensitive photoreceptor for a given wavelength (independence model of CFF), so that mid-wavelength stimuli (555 nm) was considered to isolate M-cones (although it is a matter of debate whether M-cones are indeed most sensitive at this wavelength) and long-wavelength stimuli (642 nm) isolate L-cones. Because the slopes are larger for mid-wavelength stimuli, they have concluded that M-cones are inherently faster than L-cones.

In contrast, tCSF measurements for photoreceptor isolating stimuli using the silent substitution paradigm have demonstrated higher sensitivity for L-cone isolating stimuli at high temporal frequencies, providing evidence that CFFs are higher for stimuli that isolate L-cones rather than M-cones. The triple silent substitution paradigm uses primaries with four different wavelengths to create isolating stimuli with a known Michelson contrast at the level of the concerned photoreceptor and constant adaptation of the silenced photoreceptors (14,15), which is important for controlling interaction between photoreceptors. Observe that the triple silent substitution is a stimulus that simultaneously modulates luminance and chromaticity such that the number of photon catches in only one photoreceptor type is modulated. The additional assumption of Hamer and Tyler (8) that CFFs are determined exclusively by the most sensitive cone type is not necessary. It has been found that psychophysical temporal contrast sensitivity to combined luminance and chromatic stimuli reflects properties of the parvocellular system (corresponding to a red-green color channel) at low temporal frequencies and of the magnocellular system (corresponding to an achromatic luminance channel) at high frequencies (16–19). Temporal contrast sensitivity mediated by the parvocellular system is characterized by equal sensitivity for L- and M-cone isolating stimuli. In contrast, sensitivities are generally higher for L-cone isolating stimuli when perception is mediated by the

magnocellular system, most likely reflecting the higher density of the L-cones in most observers (1,20).

An alternative way to explore photoreceptor-specific CFF is to measure them with X-linked dichromats (9,10), who lack one photoreceptor subtype (L-cones in protanopes, M-cones in deuteranopes) due to a genetic change in the corresponding opsin gene, while the remaining photoreceptors are thought to be normal. Pokorny and coworkers (9,10) have found a larger slope of the CFF-log I function in deuteranopes than in protanopes at a wavelength of 580 nm, where sensitivity was similar between groups. This suggests faster L-cone mediated responses, a finding that is again in conflict with the proposition by Hamer and Tyler.

In dichromats, postreceptoral pathways are also altered, as they lack the chromatic (parvocellular) pathway that processes L- and M-cones inputs antagonistically and possibly have a higher sensitivity in the achromatic luminance pathway which adds input L- and M-cones (under photopic conditions) (21–24). It has also been shown that S-cone modulation at frequencies above CFF can influence L- and M-cone signals via the luminance pathway, despite the fact that flicker not directly perceived (25).

The discrepancies between results from measuring CFF-log I-function measured with chromatic stimuli in trichromats on the one hand, and measurements of photoreceptor-specific tCSF functions using silent substitution stimuli on the other hand are hard to reconcile because of the close relationship between tCSF and CFF. Therefore, we measured CFF-log I-functions driven by specific photoreceptor subtypes using the triple silent substitution paradigm in dichromats and trichromats. The differences between chromatic stimuli and silent substitution stimuli can be seen in Figure 1.

A first aim was to investigate whether CFF-log I-functions for chromatic stimuli and silent substitution stimuli can be compared. Although Cao et al. (26) have used the silent substitution to measure CFFs as a function of surround retinal illuminance in order to investigate rod-cone interactions, these findings cannot be compared with the earlier findings, as the absolute amplitude of modulation remained constant.

A second aim was to compare CFF-log I-functions between photoreceptor subtypes (especially L- and M-cones) and between dichromats and trichromats. Some of the discrepancies between earlier studies can possibly be resolved and the validity of some previous assumptions (such as that the most sensitive cone type determines the CFF entirely) can be tested if involvement of postreceptoral pathways in the influence of chromaticity on CFF-log I-function would be demonstrated.

Figure 1: Differences between chromatic and silent substitution stimuli. The left panel shows the LED luminances as a function of time for the L-cone- and M-cone-isolating stimuli based on the silents substitution paradigm that we used, as well as for (hypothetical) chromatic stimuli based on the red and the cyan LEDs of our apparatus (bandwidth limited by interference filters). In contrast, the right panel shows the modulation of photoreceptor excitation calculated using the Stockman and Sharpe 10° rod fundamentals for cones (29) and the scotopic luminous efficiency function (30) for

Methods

Participants

Nine healthy volunteers participated in this research: five trichromats (three females and two males, between 27 and 36 years old), two male protanopes (52 and 28 years old), and two male deuteranopes (18 and 34 years old). All subjects underwent thorough ophthalmological assessment, including best-corrected visual acuity, automated static white-on-white perimetry, color vision testing using an anomaloscope, slit-lamp examination of the anterior segment, and funduscopy.

This study was approved by the Ethics Committee of the Friedrich-Alexander-University Erlangen-Nürnberg. The experiments adhered to the tenets of the Declaration of Helsinki and the subjects gave written informed consent prior to the experiments.

Stimulus

The stimuli were presented with an eight-channel Maxwellian view optical system that has been described in detail elsewhere (27). This apparatus creates a stimulus consisting of a small circular center (diameter 2°) and a surrounding annulus (external diameter 13°). The stimuli in each field are created by the output of four LEDs, each, with 8-10 nm bandwidth at half-height and with emission spectrum maxima at 660 nm (red), 558 nm (green), 516 nm (cyan) and 460 nm (blue). The LEDs are driven by an Asus Xonar D2-PM sound card (ASUSTek, Taipeh, Taiwan). The software controlling the output of the soundcard is custom made in C# (28). Further technical details and the calibration process have been described elsewhere (1). Retinal illuminance was modified by entering neutral density filters into the optical pathway in steps of 0.3 optical density units.

The stimuli were viewed through a 3 mm diameter artificial pupil positioned in the focus of the Maxwellian view system. The test stimuli (see below) were presented in the annular field, where LED luminances were set so that a time-averaged retinal illuminance of 587 photopic Td (without the neutral density filters) and a mean chromaticity of $x = 0.34$ and $y = 0.31$ (in CIE1931 2° coordinates) was achieved. The LEDs in this field were modulated sinusoidally around these mean light levels. The central field was used for fixation and its output was not modulated (14,15). The central field had the same chromaticity as the surrounding field, but LED luminances were set to result in a retinal illuminance of 244 photopic Td (without ND filter) in order to avoid flicker detection through stray light. The photoreceptor excitation was calculated for each LED using the Stockman and Sharpe 10° rod fundamentals for cones (29) and the scotopic luminous efficiency function (30) for rods (available on www.cvrl.org). With the four LED outputs, it was possible to calculate LED contrasts that produced steady excitation (i.e. silent substitution) in three of the four photoreceptor types. The modulation in the remaining photoreceptor class was quantified as the Michelson contrast of the excitation modulation of the concerning photoreceptor class (31) and was set to 20% rod or cone contrast to measure the CFF. In a preliminary experiment, the CFFs were measured for different values of the photoreceptor (Michelson) contrast in one subject (author CH).

Experimental procedure

The subjects were first dark adapted for 15 minutes and then positioned in front of the test instrument using a chin rest, after which they were allowed to adapt to the actual mean luminance of

the stimulus. CFF thresholds at several retinal illuminance levels were determined using a forced-choice (yes/no) paradigm with randomly interleaved double staircases, one starting at 1 Hz and the other starting at 100 Hz. The observers' responses were recorded using a gamepad on which the indicated the presence or absence of a perceivable flicker by pressing on of two buttons. Initially, the frequency increased or decreased in steps of 20 Hz. Once there was a change in flicker perception (from seen to not seen and vice versa), the step direction was reversed (from increase to decrease or vice versa) and the step size was halved. The termination criterion was a step size 0.625 Hz.

Analysis

Statistical analysis was performed using R: A language and environment for statistical computing (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org>). The plots were created using the ggplot2 package by H. Wickham (ggplot2: elegant graphics for data analysis. Springer New York, 2009).

Linear regressions were obtained from the individual CFF-log I-functions, and Student's t-tests were used to compare differences in the slopes of these lines between groups. Because this simple approach has the disadvantage of not taking into account the quality of the fits, we also performed an analysis of covariance (ANCOVA). Here, a multivariate model is fit to the pooled data of all subjects and linear coefficients are used to model differences in overall CFF levels and slopes of the CFF-log I-functions between groups. For comparisons between photoreceptor types, M-cone driven data were treated as reference group, for comparisons between observer groups, the trichromatic data comprised the reference. This procedure results in two coefficients (intercept and slope) for the reference group and two coefficients for each additional group characterizing the difference between this group and reference group (again, for intercept and slope). For each coefficient, there is a p-value that indicates whether it is significantly different from zero. We have transformed log I by subtracting 25 phot Td for the ANCOVA, so that the intercept can be interpreted as the predicted CFF at that retinal illuminance. The ANCOVA was performed using the `lm()`-function of the R package. For each ANCOVA, we report the F-value with the degrees of freedom, the p-value for the F-statistic, and the adjusted R^2 for the overall model. Furthermore, we report the coefficients and the corresponding p-values for the reference group and for groups of interest.

Results

Relation between temporal contrast sensitivity functions (tCSF) and critical flicker frequency (CFF)

We measured CFF at different Michelson contrasts for L-cone isolating stimuli in one subject (author CH) and a retinal illuminance of 294 Td to ensure that there is an approximately linear relationship between CFF and contrasts at higher contrasts. A linear relationship between CFF and contrast enables an easy comparison with previous data (8) where CFF measurements were performed with chromatic, non-silent-substitution stimuli at 100% contrast. The results are shown in Figure 2 (left panel). The curve is approximately linear down to contrasts as small as 5%. The right panel of Figure 2 illustrates how the CFFs correspond to the high-frequency part of the previously measured tCSF plot (deLange curve) in the same subject (1).

Figure 2: CFF measured as a function of Michelson contrast for L-cone-isolating stimuli in a normal trichromat (author CH). Five measurements were performed at each contrast level (the points have been randomly displaced slightly along the contrast axis when identical CFFs were obtained in order to avoid overlapping symbols). The plot on the right side shows the same data (empty triangles) plotted differently together with results from previous measurements of the temporal contrast sensitivity in the same subject and under identical conditions (filled circles, (37)). The sensitivity is the inverse of the Michelson contrast at threshold. Mean retinal illuminance was

Slopes of the individual CFF versus log retinal illuminance functions

Figure 3 displays the CFF as a function of mean retinal illuminance for the six trichromats and plotted separately for the four receptor isolation conditions. The CFFs increased linearly with increasing log retinal illuminance for all photoreceptor isolating stimuli. Thus, the Ferry-Porter law was obeyed for the cone-isolating stimuli over the whole range of retinal illuminances and for rod

isolating stimuli up to at least 25 phot Td. As mentioned in the methods section, higher mean luminances were not included for rod driven CFF measurements because sufficient isolation of rod signals was not warranted at these luminances.

Figure 3: Individual results of the CFF vs retinal illuminance measures of each photoreceptor type of the six trichromats. The blue lines are the regression lines fitted through the whole dataset, the horizontal black lines

Table 1 shows the slopes and the R^2 values of the regression lines that were fitted to the individual CFF-log I-functions. The R^2 values indicate an excellent fit of the linear model for L- and M-cone isolating stimuli, and there is little inter-individual variability in the slopes for these stimuli. The slopes are smaller for M-cone isolating stimuli than for L-cone isolating stimuli in trichromats, but not in dichromats. For S-cone- and rod-isolating stimuli, the inter-individual variability of the slopes was larger possibly due to larger differences in preretinal absorption at shorter wavelengths and because the fewer number of data for the rod isolating conditions. Slopes for the S-cone stimuli were quite variable, so that a group-wise comparison cannot be performed with confidence. The slopes for rod isolating conditions were smaller in comparison with those obtained with L- and M-cone isolating conditions.

Table 1: Slopes and R²-values for the regression lines through the CFF-log I-functions for all observers and all photoreceptor subtypes. () Despite good isolation, deuteranopes still perceived M-cone isolating stimuli. This is the result of a small residual stimulation of L-cones.*

	DOB	Group	L-cone		M-cone		S-cone		Rod	
			Slope	R ²	Slope	R ²	Slope	R ²	Slope	R ²
Subj 1	01.04.80	tri	12.49	0.99	9.26	0.96	12.18	0.94	5.17	0.97
Subj 2	10.12.87	tri	11.88	0.98	9.36	0.99	10.17	0.91	5.83	0.92
Subj 3	13.03.85	tri	11.83	0.98	11.18	0.92	5.22	0.79	8.50	0.64
Subj 4	08.11.82	tri	13.09	0.95	9.76	0.93	9.87	0.86	-0.24	0.04
Subj 5	06.10.78	tri	13.87	0.99	10.10	0.99	6.19	0.79	7.67	0.89
Subj D1	29.06.96	deuter	13.41	0.98	(15.15)*	(0.98)*	6.81	0.96	3.00	0.75
Subj D2	01.03.81	deuter	11.43	0.96	(10.36)*	(0.95)*	4.36	0.97	3.00	0.92
Subj P1	24.07.62	prot	-	-	15.35	1.00	13.57	0.90	4.33	0.90
Subj P2	10.12.86	prot	-	-	13.29	0.99	5.78	0.94	3.00	0.88

Differences between photoreceptor subtypes in trichromats

To test whether the differences between L-cone- and M-cone-driven stimuli in trichromats were significant, we have performed a paired t-test. The test indicated that slopes were significantly larger for L-cone- than for M-cone isolating stimuli (mean: 12.14 vs. 9.19 Hz/log phot Td, $p = 0.008$). To account for the quality of the individual fits in the statistical analysis (rather than only the resulting slopes) when comparing all four photoreceptor subtypes in trichromats (see Figure 3), we have performed an analysis of covariance (ANCOVA). A minor limitation is that inter-individual variability is not taken into account in these models. To improve interpretability, log I was transformed by subtracting 25 phot Td, so that the intercepts correspond to the CFF at that light level, the logarithm of which is in the center of the employed log retinal illuminance range for cones and at the upper limit of the measured range for rods. A significant regression equation was found with an F-statistic $F(7, 156)$ of 226 ($p < 0.001$, adjusted $R^2 = 0.91$). In this model, M-cones were used as the reference group. For this photoreceptor subtype, the mean CFF at 25 phot Td was 18.5 Hz. The CFFs at that light levels were significantly different for L-cones (27.5 Hz, $p < 0.001$) and S-cones (9.7 Hz, $p < 0.001$). For rod-isolating stimuli, it was not significantly different from the M-cone driven CFFs (18.8, $p = 0.85$).

The slope of the M-cone-driven CFF was found to be 9.9 Hz/log phot Td. For L-cone isolating stimuli, there was a significant slope difference of 2.6 Hz/log phot Td ($p < 0.001$), resulting in a larger estimated change of 12.6 Hz/log phot Td. These values correspond well to the values estimated by averaging the individual slopes, mentioned above. For the rod-isolating stimuli, the slope of the CFF-log I-function was smaller by 3.9 Hz/log phot Td ($p < 0.05$). In contrast, the parameters estimating the slope differences between M-cones and S-cones were not significantly different from zero (1.3 Hz/log phot Td, $p = 0.13$).

Protanope subjects: M-cones

We used a similar model to compare the CFF-log I-functions for M-cone isolating stimuli between protanopes and trichromats (Figure 4). Again, a significant regression equation was found with an

F-statistic $F(3, 66)$ of 548.5 ($p < 0.001$, adjusted $R^2 = 0.95$). CFF at 25 phot Td was estimated to be about 7 Hz higher in protanopes than for the M-cones in trichromats (25.3 Hz vs. 18.5 Hz, $p < 0.001$). Furthermore, the slopes were significantly different ($p < 0.001$), with estimated values of 9.9 Hz/log phot Td for M-cone stimulation in trichromats and 14.3 Hz/log phot Td in protanopes. In addition, we performed an unpaired t-test on the slopes from Table 1. It confirmed that the slopes for M-cone isolating stimuli were much larger in protanopes than in trichromats (unpaired t-test, mean: 14.32 Hz/log phot Td in protanopes vs. 9.19 Hz/log phot Td in trichromats, $p = 0.044$)

Figure 4: Comparison of CFF-log I-functions for each L-cone- and M-cone isolating stimuli between trichromats and dichromats. The horizontal lines

Deuteranope subjects: L-cones

The ANCOVA model was also significant for modelling L-cone-driven CFF-log I-functions in deuteranopes and trichromats with an F-statistic $F(3, 56)$ of 427.5 ($p < 0.001$, adjusted $R^2 = 0.96$). The functions were similar in deuteranopes and L-cone driven CFFs in trichromats (Figure 4), showing no statistically significant differences either in the slopes (12.4 Hz/log phot Td in deuteranopes vs. 12.6 Hz/log phot Td in trichromats, $p = 0.843$) or in the intercepts (27.9 Hz vs. 27.5 Hz, $p = 0.469$) between the two groups. Again, this was confirmed by an unpaired t-test on the slopes shown in Table 1: the slopes for L-cone isolating stimuli in deuteranopes were similar to those in trichromats (unpaired t-test, mean: 12.42 Hz/log phot Td in deuteranopes vs. 12.14 Hz/log

phot Td in trichromats, $p = 0.828$). Observe that both intercepts and slopes were similar to those of the M-cone driven CFFs in protanopes.

S-cone- and rod-mediated CFF in dichromats

There was no clear difference between dichromats and trichromats either in the S-cone- or in the rod-driven CFF-log I-functions. Like in the trichromats, the rod-driven functions had much smaller slopes compared with L- and M-cones in dichromats. For the S-cone-mediated CFF-log I-functions, it is not possible to draw definite conclusions owing to the large inter-individual variability.

Discussion

Our experiments show that CFF-log I-functions for chromatic stimuli and for silent substitution stimuli yield qualitatively similar results: Firstly, the Ferry-Porter law, describing a linear relationship between CFF and log retinal illuminance (3,4), is obeyed for silent substitution stimuli: for L-, M-, and S-cone isolating stimuli over a range of retinal illuminance between 1.2 and 587 phot Td, and for rod-isolating stimuli over a range from 1.2 phot Td up to at least 25 phot Td. Secondly, our experiments confirms that the CFF depends on the absolute amplitude of modulation rather than on the contrast or on the mean luminance per se (32). This is illustrated in Figure 5 which combines data from Figures 2 and 3. The CFFs are plotted as a function of absolute modulation. Anchor point was the CFFs at 20% contrast and 294.2 Td. This condition was used in both measurements whose results are shown in Figures 2 and 3. Absolute modulation was varied either by changing contrast (red triangles) or by changing mean retinal illuminance (blue circles). The plot shows that CFF depends linearly on absolute modulation with a slope of 12Hz / log unit for both changes in retinal illuminance and contrast with slight deviations at contrasts below 5%. As a consequence, our data can be compared with the results of earlier experiments, where measurements were performed with chromatic stimuli and Michelson contrast of 100%, simply by shifting the CFF-log I-function horizontally (5,8). The advantage of the silent substitution paradigm is that it allows better control of both the involved photoreceptor classes and the interaction between photoreceptors.

Figure 5: L-cone-driven CFF as a function of the logarithm of absolute amplitude of modulation relative to the absolute amplitude at 294.2 Td and 20Hz, where amplitude was varied by changing either Michelson contrast (red triangles: data from Figure 2) or retinal illuminance (blue circles: data from Figure 3). The red solid line indicates the linear relationship for Michelson contrasts between 5% and 20%: here the function is almost identical to the data from the main experiments (blue dashed line). It can be appreciated that this There are slight deviations from the linear relationship

The best correspondence between the results of measurements with chromatic and silent substitution stimuli are expected for long wavelength chromatic stimuli and L-cone-isolating silent substitution stimuli, because CFFs are basically determined by L-cone activity (see Figure 1). In the literature, the slopes of the CFF-log I-functions were generally smaller (9.3-12.5 Hz) for long-wavelength stimuli (630 to 660 nm) (8,9,11,12), but this can to a large extent explained by the smaller stimulus areas that were previously used (between 0.5° and 8.6°; Granit-Harper law).

More obvious are the differences between the data obtained with middle wavelength chromatic stimuli and M-cone isolating stimuli. We found that M-cone isolating stimuli yielded smaller slopes of the CFF vs. log(I) plots than those obtained with mid-wavelength chromatic stimuli. Hamer and Tyler (8) proposed that detection of the mid-wavelength chromatic stimuli were exclusively determined by the M-cones. However, we found that slopes and overall CFFs were smaller for M-cone- than for L-cone isolating stimuli, whereas slopes were larger for medium-wavelengths (480 to 555 nm) than for long-wavelength stimuli (8,9,11,12). We propose that the assumption that chromatic CFFs are mediated only by the most sensitive photoreceptor class for a given wavelength (independence model) is incorrect. In addition, the notion that the high frequency limb of the CSF is determined by the luminance pathways indicates that CFFs are also mediated by the luminance (magnocellular) pathway and that its properties cannot be explained solely on the basis of photoreceptor characteristics. We propose that the larger slopes for L-cone isolating stimuli could then be explained by the stronger L-cone input to the magnocellular pathways based on their larger numerosity. Mid-wavelength chromatic stimuli would also be a stronger stimulus for the luminance pathway than long-wavelength stimuli, thereby explaining the larger slopes for green stimuli.

Further support for magnocellular influence on the slope of the CFF-log I-functions comes from in the data on dichromats. The slopes of the M-cone-driven CFF-log I-functions were much larger in protanopes than in trichromats. Assuming that the missing cone type is replaced by the remaining cone type would explain larger M-cone input to the magnocellular pathway in protanopes and thus the larger slopes of the CFF-log I-functions. Thus, signals from the M-cones would be “diluted” by signals from the L-cones at a postreceptoral level. The fact that slopes for L-cone-driven CFF-log I-functions are not markedly reduced could be explained by the larger number of L-cones compared with M-cones in most subjects, which also produces higher flicker sensitivities at high temporal frequencies (1,20). Unfortunately, the small number of dichromats that we measure does not allow direct comparison with the study by Pokorny and coworkers, although M-cone-mediate CFF-log I-functions of protanopes seemed to have larger instead of smaller slopes (9).

Especially for L- and M-cone isolating stimuli, the inter-individual variability was intriguingly small compared with the systematic variation caused by changes in retinal illuminance. In contrast, the CFF-log I functions for S-cone isolating stimuli were more variable than for the other photoreceptor types, possibly due to prereceptoral filtering (33). However, our results confirmed much smaller S-cone-driven CFFs compared with L- and M-cone-driven ones (34,35). For rods, it is known that the Ferry-Porter-law does not hold under most conditions (5,36). Rods are responsible for failure of this law at low retinal illuminances, when no special preconditions are taken to isolate photoreceptor subtypes (5). Rod-mediated CFF-log I-functions generally display a linearly increasing portion, followed by a plateau at retinal illuminances above 1 scotopic Troland, before the slope increases and the function becomes linear once more (36). In our study, rod driven CFFs

were not measured at retinal illuminances above 25 phot Td in order to avoid cone intrusion because we have found evidence of rod intrusion at high temporal frequencies and high retinal illuminances in an earlier study with a similar setup (2). However, the Ferry-Porter law was valid over this range.

There are minor limitations to our study. As mentioned above, the relative small number of observers, especially dichromats, makes it difficult to study inter-individual variability. Furthermore, we did not employ an observer calibration because this is time consuming. We have previously shown that the employed procedure circumvents a tedious and time consuming observer calibration that is also prone to large variabilities (1).

We observed residual flicker detection of M-cone isolating stimuli by deuteranopes. Residual stimulation of unwanted photoreceptor types, albeit with small contrasts, may occur due to pre-receptoral filtering or polymorphisms in the opsin genes(1). The relatively large CFFs that we measured in deuteranopes can be explained by the small slope of the linear portion of the CFF vs. Michelson contrast curve: CFF changes only slightly even for substantial changes in stimulus contrast (Figure 2). The fact that the slopes of the CFF-log I-functions were similar for L-cone- and M-cone isolating stimuli in the deuteranopes, but with generally about 5-10 Hz smaller CFFs, suggests that perception is mediated by residual stimulation of L-cones, agreeing with theoretical calculations (1). However, our data also demonstrate that such an intrusion is not relevant in trichromats, because they display significant slope differences for the L- and M-cone mediated CFF vs. log I lines.

In conclusion, we have shown that the CFF-log I-functions measured with the silent substitution paradigm agree with those measured with chromatic stimuli in that they obey the Ferry-Porter law over 3 log units of retinal illuminance and in that they depend on the absolute amplitude of modulation. However, there are systematic differences in the CFFs and the slopes of the CFF-log I-functions between the photoreceptor subtypes in trichromats. Differences between dichromats and trichromats highlight the relevance of post-receptoral interaction when interpreting CFF-log I-functions. The differences between L- and M-cone-driven CFFs cast go against on earlier suggestions that temporal processing is faster in M-cones. Measuring CFF may be a fast and useful way to characterize the light-adaptation of temporal contrast sensitivity of the luminance pathway but not of the chromatic pathway.

References

1. Huchzermeyer C, Kremers J. Perifoveal L- and M-cone-driven temporal contrast sensitivities at different retinal illuminances. *J Opt Soc Am A*. 2016 Oct 1;33(10):1989.
2. Huchzermeyer C, Kremers J. Perifoveal S-cone and rod-driven temporal contrast sensitivities at different retinal illuminances. *JOSA A*. 2017 Feb 1;34(2):171–83.
3. Ferry ES. Persistence of vision. *Am J Sci*. 1892 Sep 1;3-44(261):192–207.
4. Porter TC. Contributions to the Study of Flicker. Paper II. *Proc R Soc Lond*. 1902 Jan 1;70(459–466):313–29.

5. Tyler CW, Hamer RD. Analysis of visual modulation sensitivity. IV. Validity of the Ferry-Porter law. *JOSA A*. 1990;7(4):743–758.
6. Kelly DH. Adaptation effects on spatio-temporal sine-wave thresholds. *Vision Res*. 1972 Jan;12(1):89–101.
7. Rovamo J, Raninen A. Critical flicker frequency and M-scaling of stimulus size and retinal illuminance. *Vision Res*. 1984;24(10):1127–31.
8. Hamer RD, Tyler CW. Analysis of visual modulation sensitivity. V. Faster visual response for G-than for R-cone pathway? *JOSA A*. 1992;9(11):1889–1904.
9. Pokorny J, Smith VC. Luminosity and CFF in deuteranopes and protanopes. *J Opt Soc Am*. 1972 Jan;62(1):111–7.
10. Lutze M, Smith VC, Pokorny J. Critical flicker frequency in X-chromosome linked dichromats. *Doc Ophthalmol Proc Ser*. 1989;52:69–77.
11. Giorgi A. Effect of wavelength on the relationship between critical flicker frequency and intensity in foveal vision. *J Opt Soc Am*. 1963 Apr;53:480–6.
12. Ives HE. Studies in the photometry of lights of different colours. II. Spectral luminosity curves by the method of critical frequency. *Philos Mag*. 1912;24:352–70.
13. Hecht S, Shlaer S. Intermittent Stimulation by Light: V. the Relation Between Intensity and Critical Frequency for Different Parts of the Spectrum. *J Gen Physiol*. 1936 Jul 20;19(6):965–77.
14. Estevez O, Spekreijse H. The “silent substitution” method in visual research. *Vision Res*. 1982;22(6):681–691.
15. Kremers J. The assessment of L- and M-cone specific electroretinographical signals in the normal and abnormal human retina. *Prog Retin Eye Res*. 2003 Sep;22(5):579–605.
16. Lee BB, Pokorny J, Smith VC, Martin PR, Valberg A. Luminance and chromatic modulation sensitivity of macaque ganglion cells and human observers. *J Opt Soc Am A*. 1990 Dec;7(12):2223–36.
17. Smith VC, Pokorny J, Davis M, Yeh T. Mechanisms subserving temporal modulation sensitivity in silent-cone substitution. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis*. 1995 Feb;12(2):241–9.
18. Kremers J, Lee BB, Kaiser PK. Sensitivity of macaque retinal ganglion cells and human observers to combined luminance and chromatic temporal modulation. *JOSA A*. 1992;9(9):1477–1485.
19. Lee BB, Martin PR, Valberg A, Kremers J. Physiological mechanisms underlying psychophysical sensitivity to combined luminance and chromatic modulation. *J Opt Soc Am A*. 1993 Jun;10(6):1403–12.
20. Kremers J, Scholl HP, Knau H, Berendschot TT, Usui T, Sharpe LT. L/M cone ratios in human trichromats assessed by psychophysics, electroretinography, and retinal densitometry. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis*. 2000 Mar;17(3):517–26.

21. Janáky M, Borbély J, Benedek G, Kocsis BP, Braunitzer G. Achromatic luminance contrast sensitivity in X-linked color-deficient observers: An addition to the debate. *Vis Neurosci*. 2014 Jan;31(01):99–103.
22. Bailey JE. Flicker fusion thresholds of red-green dichromats. *Mod Probl Ophthalmol*. 1978;19:201–5.
23. Lennie P. Temporal modulation sensitivities of red- and green-sensitive cone systems in dichromats. *Vision Res*. 1984;24(12):1995–9.
24. Lutze M, Pokorny J, Smith VC. Achromatic parvocellular contrast gain in normal and color defective observers: Implications for the evolution of color vision. *Vis Neurosci*. 2006 Aug;23(3–4):611–6.
25. Stockman A, MacLeod DI, Lebrun SJ. Faster than the eye can see: blue cones respond to rapid flicker. *J Opt Soc Am A*. 1993 Jun;10(6):1396–402.
26. Cao D, Lu YH. Lateral suppression of mesopic rod and cone flicker detection. *JOSA A*. 2012;29(2):A188–A193.
27. Pokorny J, Smithson H, Quinlan J. Photostimulator allowing independent control of rods and the three cone types. *Vis Neurosci*. 2004 Jun;21(3):263–7.
28. Puts MJH, Pokorny J, Quinlan J, Glennie L. Audiophile hardware in vision science; the soundcard as a digital to analog converter. *J Neurosci Methods*. 2005 Mar 15;142(1):77–81.
29. Stockman A, Sharpe LT. The spectral sensitivities of the middle- and long-wavelength-sensitive cones derived from measurements in observers of known genotype. *Vision Res*. 2000;40(13):1711–37.
30. Wald G. Human Vision and the Spectrum. *Science*. 1945 Jun 29;101(2635):653–8.
31. Shapiro AG, Pokorny J, Smith VC. Cone-rod receptor spaces with illustrations that use CRT phosphor and light-emitting-diode spectra. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis*. 1996 Dec;13(12):2319–28.
32. Kelly DH. Diffusion Model of Linear Flicker Responses*. *JOSA*. 1969 Dec 1;59(12):1665–70.
33. Huchzermeyer C, Schlomberg J, Welge-Lüssen U, Berendschot TTJM, Pokorny J, Kremers J. Macular pigment optical density measured by heterochromatic modulation photometry. *PloS One*. 2014;9(10):e110521.
34. Brindley GS, Du Croz JJ, Rushton WA. The flicker fusion frequency of the blue-sensitive mechanism of colour vision. *J Physiol*. 1966 Mar;183(2):497–500.
35. Wisowaty JJ, Boynton RM. Temporal modulation sensitivity of the blue mechanism: measurements made without chromatic adaptation. *Vision Res*. 1980;20(11):895–909.
36. Conner JD, MacLeod DI. Rod photoreceptors detect rapid flicker. *Science*. 1977 Feb 18;195(4279):698–9.
37. Huchzermeyer C, Kremers J. Perifoveal L- and M-cone-driven temporal contrast sensitivities at different retinal illuminances. *J Opt Soc Am A*. 2016 Oct 1;33(10):1989.

Acknowledgements

Supported by the German Research Foundation (DFG KR1317/13-1; JK), Federal Ministry of Education and Research of Germany (BMBF 01DN14009; JK), São Paulo Research Foundation (FAPESP 2014/06457-5; BVN, FAPESP 2007/55125-1; MTSB, FAPESP 2012/01115-3; DFV), joint Bavarian Academic Center for Latin America and São Paulo Research Foundation program (FAPESP-BAYLAT 2012/51299-3; DFV, JK), Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq 490428/2013-4; MTSB and BVN; CNPq 470785/2014-4; MTSB, CNPq 490428/2013-4; DFV) and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES 3263/2013; BVN).

ANEXO 4 - L-/M-cone opponency in visual evoked potentials of the human cortex.

Artigo em processo de publicação

1 L-/M-cone opponency in visual evoked potentials of the human cortex

2
3 Mirella Telles Salgueiro Barboni^{1,2}, Balázs Vince Nagy^{1,4}, Cristiane Maria Gomes

4 Martins¹, Daniela Maria Oliveria Bonci^{1,5}, Einat Hanzman^{1,5}, Avinash Aher³, Tina I.

5 Tsai³, Jan Kremers³, Dora Fix Ventura^{1,5}

6
7 ¹Department of Experimental Psychology, University of Sao Paulo, Brazil; ²Department
8 of Ophthalmology, Semmelweis University, Budapest, Hungary; ³Department of
9 Ophthalmology, University Hospital Erlangen, Germany, ⁴Department of Mechatronics,
10 Optics and Engineering Informatics, Budapest University of Technology and
11 Economics, Budapest, Hungary; ⁵Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert
12 Einstein, Sao Paulo, Brazil

13
14 CORRESPONDING AUTHOR

15 Mirella Telles Salgueiro Barboni

16 Av. Prof. Mello Moraes, 1721, Bloco D, Sala 206

17 05508-030 São Paulo, SP, Brazil

18 Phone Number: +55 11 30914263

19 E-mail: mirellabarboni@usp.br

20
21 Running head: Cone-isolated VEPs

27 ABSTRACT

28

29 L- and M-cones send their signals to the cortex using two chromatic
30 (parvocellular and blue-yellow koniocellular) and one luminance (magnocellular)
31 pathways. These pathways contain ON and OFF sub-pathways that respond to
32 excitation increments and decrements respectively. Here, we report on VEP recordings
33 that reflect L- and M-cone driven increment (L_I and M_I) and decrement (L_D and M_D)
34 activity. VEP recordings were performed on 12 trichromats and four dichromats (two
35 protanopes and two deuteranopes). We found that the responses to L_I strongly
36 resembled those to M_D , and that L_D and M_I responses were very similar. Moreover, the
37 lack of a photoreceptor type (L or M) in the dichromats led to a dominance of the ON
38 pathway of the remaining photoreceptor type. These results provide electrophysiological
39 evidence that antagonistic L/M signal processing, already present in the retina and the
40 LGN, is also observed at the visual cortex. These data are in agreement with results
41 from human psychophysics where M_I stimuli lead to a perceived brightness decrease
42 whereas L_I stimuli resulted in perceived brightness increases. VEP recording is a non-
43 invasive tool that can be easily and painlessly applied. We propose that the technique
44 may provide information in the diagnosis of color vision deficiencies.

45

46 Keywords: dichromat; color vision; silent substitution; visual evoked potential; visual
47 pathways

48

49

50

51

52

INTRODUCTION

Light stimulation, using "spectral compensation" or "silent substitution" methods allow the independent modulation of a single photoreceptor type (Estévez & Spekreijse, 1974, 1982; Kremers, 2003). For instance, L- or M-cones can be selectively stimulated so that the downstream neural activity is driven uniquely by the L or by the M photoreceptor types. Similarly, stimuli that emphasize photoreceptor excitation onset or offset, such as the luminance increments (rapid-on) or decrements (rapid-off) sawtooth stimulus profiles, can be used to evoke activity driven by ON and OFF subprocesses, respectively. In the present study, we used the silent substitution stimulation method to isolate L- and M-cone responses combined with cone excitation increments (ON) or decrements (OFF) using sawtooth modulation profiles.

In trichromatic subjects, L-cone driven ERG responses to rapid-on excitation increments (i.e. ON stimuli) resemble responses recorded with rapid-on luminance increments that are driven by both (L and M) types of photoreceptors. Similarly, L-cone driven decrements (rapid-off stimulation) elicited ERGs resembling luminance OFF responses (for the rapid-on and –off white stimulation see Barboni et al. 2013; for cone isolated rapid-on and –off stimulation see McKeefry et al. 2014; Kremers et al. 2014; Tsai et al. 2016). In addition, L-cone driven responses to full field sinusoidal stimuli have larger amplitudes than those elicited by M-cone isolating full field stimuli (Jacob et al., 2015), indicating that the retina is L-cone dominated in most trichromatic subjects.

Another interesting observation is that L-cone driven increment (L_I) ERG responses bear resemblance to M-cone driven decrement (M_D) responses. Similarly, ERG responses to L_D and to M_I display peaks and troughs with similar amplitudes and

78 implicit time (McKeefry et al., 2014; Kremers et al., 2014; Tsai et al., 2016). This aligns
79 well with the L/M cone opponency in the parvocellular pathway, the earliest visual
80 substrate for the perception of the red-green chromatic contrast. Furthermore, recent
81 investigations on visual perception using L- or M-cone selective stimuli showed that the
82 M-cone increments are perceived as a brightness decrement by subjects with normal
83 color vision, whereas L-cone increments were perceived as brightness increments (Parry
84 et al. 2016).

85 In the retina, cone increment and decrement responses are processed by distinct
86 pathways mediated by bipolar cells with different types of membrane receptors, which
87 are depolarized or hyperpolarized by a cone excitation change (Werblin & Dowling,
88 1969; Kaneko, 1973). However it is not completely known how these retinal signals are
89 processed by the brain.

90 The purpose of the study was to examine if the increments and decrements are
91 processed in the visual cortex just as in the ERG recordings and in the psychophysical
92 experiments. Since both these techniques revealed similarities between L- and M-cone
93 signals of opposite polarities, the working hypothesis for the present study was that
94 cortical processing recorded by the VEPs (an intermediate level between retinal and
95 psychophysical responses) will also be able to reveal similar opponent processes.

96 We found that VEPs of L- and M-cone increments (ON; L_I and M_I) were quite
97 different from each other. Similarly, L- and M-cone decrements (OFF; L_D and M_D) have
98 shown dissimilar VEPs. However, in agreement with our hypothesis, L- and M-cone
99 responses of opposite polarity resembled each other (i.e. L_I responses resembled M_D
100 VEPs whereas M_I and L_D VEP were similar).

101

102

MATERIALS AND METHODS

Participants

The experiments adhered to the tenets of the Declaration of Helsinki and were approved by the ethics committee of the University Hospital, University of São Paulo, Brazil (CEP-HU/USP 156.826). Signed informed consent was obtained from each subject after explanation of the nature and possible consequences of the study. The inclusion criteria were: best-corrected visual acuity of 20/20, absence of ophthalmological diseases as well as of any other disease that could affect the visual system. Participants were 16 volunteers: 12 trichromatic (mean age 20 ± 7 years), two protanope (21 and 23 years old) and two deuteranope (33 and 39 years old), whose color vision deficiency was confirmed genetically (see below). Color vision phenotype of all subjects was determined by the Cambridge Colour Test (CCT; Regan et al. 1994). See Table 1 for results of the CCT.

==== Insert Table 1 about here ====

Genetic analysis

An analysis of the visual pigment genes was performed to confirm the psychophysical color vision classification of the dichromats. DNA samples were extracted from Buccal Brush using the Gentra Puregene Buccal Cell Kit (Gentra Systems, Inc., Minneapolis, Minn., USA). To evaluate the presence of L or M genes on the X chromosome, a genetic test was performed according to Neitz and Neitz (1995). Exons 2, 3 and 4 of the genes were amplified with Polymerase Chain Reaction (PCR) and the PCR products were sequenced to evaluate the presence of polymorphisms in the

128 genes. PCRs were carried out using High Fidelity Platinum Taq Polymerase, 10x High
129 Fidelity Buffer, MgCl₂ (Invitrogen), 10mM GeneAmp dNTPs (Applied Biosystems,
130 Inc.) and 20mM primers in 50µl reactions. The primers used and the PCR conditions
131 were the same as described by Neitz et al. (2004). PCR products were visualized by
132 electrophoresis in 1.0% agarose gel and purified with Illustra GFXTM PCR DNA and
133 Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). The
134 PCR products were directly sequenced in both directions with BigDye® Terminator
135 v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Inc.) and the 3500 Applied
136 Biosystems Sequencer. Electropherograms were visualized and aligned in BioEdit
137 v7.0.9.0 (Hall 1999).

138

139 *VEP recordings*

140 The pupil was dilated with a drop of mydriaticum (0.5% tropicamide). VEP
141 responses were acquired from one randomly chosen dilated eye (the other eye was
142 covered by a patch) using gold cup skin electrodes placed on the scalp according to the
143 International 10/20 system (American Clinical Neurophysiology, 2006). The active
144 electrode was in position Oz. The reference electrode was placed in position Fz and the
145 ground electrode was placed on the forehead. The impedances between all electrodes
146 were below 5 kΩ. The signals were amplified 100,000x, filtered between 1 and 300 Hz,
147 and sampled at 1024 Hz using the RetiPort system (Roland Consult, Brandenburg,
148 Germany). At least 20 episodes, each lasting one second, were averaged. The first two
149 seconds of each episode were discarded to avoid onset artifacts.

150

151 *Visual stimulation*

152 Light stimulation was provided by a Super Color Ganzfeld Q450SC (Roland
153 Consult, Brandenburg, Germany) equipped with six arrays of light-emitting diodes
154 (LEDs) of different colors. As previously described (Kremers et al., 2014; Tsai et al.,
155 2016), the stimuli were developed to provide triple silent substitution conditions for the
156 L- or M-cones. Briefly, four LED types were activated: red (peak wavelength $\pm$ full
157 width at half maximum: 638 ± 9 nm), green (523 ± 19 nm), blue (469 ± 11 nm), and
158 amber (594 ± 8 nm). Mean luminance, stimulus temporal profile, modulation depth,
159 phase and temporal frequency of each LED were independently controlled by the
160 RETiport software. The luminance of each of the four primaries LED arrays was
161 modulated with rapid-on and rapid-off sawtooth luminance profiles (Table 2). It
162 allowed the rods to be unmodulated in stimuli in which either the excitation of the L-
163 cones or the excitation of the M-cones was rapidly incremented or decremented.

164 The mean luminance (284 cd/m^2) and the mean chromaticity ($x = 0.5686$, $y =$
165 0.3716 ; CIE 1931 color space), and thus the state of adaptation, was the same for all
166 stimulus conditions. The scotopic retinal illuminance, calculated from the scotopic
167 spectral sensitivity of the eye (rods) and the stimulus spectral distribution, was
168 approximately 5600 scot Td considering 8 mm pupil diameter and the photopic retinal
169 illuminance was 14275 Td. It was previously shown that in ERG measurements rod
170 isolating stimuli (25% rod contrast) did not elicit significant rod driven responses above
171 about 400 Td (Maguire et al., 2016). Therefore, rod driven signals are negligibly small.
172 L- and M-isolation provided very similar contrasts: 18% and 17% of modulation
173 contrast, respectively. The tests were performed in a dark room (lower than 10^{-4} cd/m^2
174 photopic luminance).

175

176 L- or M-cones were stimulated with a 4 Hz sawtooth temporal modulation of
177 cone excitation in two conditions: rapid-on (increments) and rapid-off (decrements).
178 Each increment cycle consisted of an abrupt increment in cone excitation, to activate the
179 ON mechanism, followed by a linear decrease in excitation. Decrement profiles were
180 the opposite, to activate the OFF mechanism (see Tsai et al., 2016 for the description of
181 the visual stimulation).

182 The characteristics of the stimuli for each protocol are shown in Table 2. The
183 stimuli allowed independent control of rod, L-, M-, and S-cone photoreceptor outputs,
184 defined as the Michelson contrast around a mean excitation.

185

186 === Insert Table 2 about here ===

187

188 *Data analysis*

189 Peak and trough analysis and Fast Fourier Transformation (FFT) were applied to
190 the signals in order to obtain the amplitude and implicit time/phase responses. In the
191 time domain analysis, the implicit times of three components (N1, P1, and N2; see
192 Figure 2C for definitions) were measured. The amplitude of the N1 component was
193 defined as the difference between the signal at the sudden excitation change in the
194 stimulus (baseline) to the minimum of the component (typically between 20 and 60 ms
195 after the sudden excitation change). The P1 amplitude was defined as the voltage
196 difference between the minimum of the N1 to the peak of the P1 component (within a
197 time window between 100 and 150 ms after the sudden change in cone excitation).
198 Finally, the N2 amplitude was measured as the voltage difference between the P1 peak
199 and the subsequent N2 minimum (typically between 180 and 220 ms after the sudden
200 excitation change). Comparisons were performed using Student's t-test, after verifying

201 the normality of the parameter distribution (Shapiro-Wilk test). Pearson's correlation
202 was calculated to analyze the relationship between the different stimulus conditions.

203

204 RESULTS

205

206 Figure 1 shows the average ($\pm$ one standard deviation; shown as the shaded area)
207 response of the trichromatic subjects ($N = 12$) for the four conditions: L- and M-cone
208 driven responses are shown in the upper and lower rows respectively. Each signal
209 displays the response to four stimulus cycles. Left and middle columns display the
210 response to increments and decrements respectively. The right columns display the
211 addition of increment and the decrement signals (rapid-on + rapid-off). The additions
212 give a visualization of the asymmetry between ON and OFF mechanisms (Pangeni et al.
213 2012). The additions are large and similar for L- and M-cone driven VEPs indicating
214 similar ON-OFF asymmetries. Furthermore, the L_I responses were similar to the M_D
215 responses and the L_D and M_I responses resembled each other.

216 The responses were further analyzed by measuring amplitudes and implicit times
217 of the first negative component (N1), the positive component (P1) and the second
218 negative wave (N2). For this analysis, the responses to the four cycles, as shown in
219 Figure 2, were further averaged to obtain the response to a single cycle. Due to a large
220 response variability between subjects (sometimes some components could not be
221 observed) the time domain analysis was occasionally difficult. Therefore, we also
222 conducted a frequency domain analysis, in order to obtain the amplitudes and phases of
223 the first (4 Hz) and the second (8 Hz) harmonics.

224

225 === Insert Figure 1 about here ===

226

227 The averaged responses to one stimulus cycle are shown in Figure 2. Increment
228 and decrement selective cone driven responses were superimposed in A and B in order
229 to compare their time to peak values and amplitudes. Although the troughs and peaks
230 occur at similar times there are profound differences between the two (visualized by the
231 thick traces below the responses that show the squared distances at each instant). The
232 major L_D positivity is somewhat smaller than that of L_I . Furthermore, the L_D response
233 displays a secondary positivity preceding the peak that is larger than in the L_I response.
234 Figure 2B shows that M_I and M_D responses differ in a similar manner as the L-cone
235 driven responses, however in an opposite manner: the M_I response displays a smaller
236 main peak but a larger secondary peak in comparison with the M_D response. The thick
237 traces below the averaged responses display the squared distances between the
238 increment and decrement responses to visualize systematic differences between the two.
239 Obviously, the differences between the two were similar for L- and M-cone isolating
240 stimuli. The sum of squared distances were calculated for each subject to quantify the
241 overall difference between the responses. They were 434 and 338 μV^2 , in average, for
242 M_I - M_D and for L_I - L_D responses, respectively.

243 Figure 2C and 2D show the comparison between L_I and M_D and between L_D and
244 M_I , respectively. Here the peaks and troughs occur at the same time with similar
245 amplitudes and the responses are generally very similar as it is also shown by the
246 squares of the differences, which show only minor deviations from zero. The sum of the
247 squared distances were 200 and 172 μV^2 , in average, for the L_I - M_D comparison and for
248 the M_I - L_D comparison, respectively.

249 Figure 2E and 2F show the comparison between L and M responses, respectively
250 of each type, increment (left) and decrement (right), in order to show the differences

251 between the two (also visualized by the squared distances given as thick traces below).
252 The sum of the squared distances were 362 and 457 μV^2 , in average, for the L_I - M_I
253 comparison and for the L_D - M_D comparison, respectively. Table 3 shows the statistical
254 comparisons of the sum of squared distances. Observe that in the comparisons with the
255 sum of squared distances between L_I - M_D and with L_D - M_I , they were significantly higher
256 ($p < 0.05$).

257

258 === Insert Figure 2 and Table 3 about here ===

259

260

261 Figures 3 and 4 show the correlations between amplitudes and phases of the 1st
262 and 2nd harmonic response components obtained in the different conditions from the 12
263 trichromatic subjects. In agreement with the results shown above, the 1st and 2nd
264 harmonic amplitudes of L_I and M_D responses (Pearson's $r = 0.8$; $p = 0.002$ and $r = 0.6$; p
265 $= 0.03$, respectively) and of L_D and M_I responses (Pearson's $r = 0.7$; $p = 0.02$ and $r = 0.8$;
266 $p = 0.004$ respectively; Figures 3 and 4; upper graphs) were positively correlated. 1st
267 and 2nd harmonic L_D and M_I response phases (lower graphs) also showed a significant
268 positive correlation (Pearson's $r = 0.9$; $p = 0.001$ and $r = 0.9$; $p < 0.001$). The phases of
269 L_I and M_D show a tendency of correlation, we would expect this to be statistically
270 significant at higher test result numbers. The other components were not significantly
271 correlated.

272

273 === Insert Figures 3 and 4 about here ===

274

275 Figure 5 shows the averaged responses of the control group (upper traces),
276 similar as in the lower graphs of Figure 2, and the individual responses of four
277 dichromatic (two protanopic and two deuteranopic) subjects. The genetic analysis of
278 these subjects showed the presence of only one copy of the L-opsin gene and no M-
279 opsin gene in the two deuteranope subjects. One protanope had one M-opsin gene and
280 no L-opsin gene. No polymorphisms in the L- or the M-opsin genes were found. The
281 other protanope subject had two copies of the M-opsin gene and no L-opsin gene, and
282 one of the M copies had polymorphisms in the exon 2.

283 Similar as in Figure 2, we plotted L_I together with M_D , and L_D together with M_I
284 responses. Unlike the responses of the color normal subjects, the L_I and M_D responses
285 were not similar in the dichromatic subjects. Also the L_D and M_I responses were
286 different. In both cases, the responses to stimulation of the non-present cones were very
287 small. Interestingly, we found a smaller response to L_D in the deuteranope subjects and
288 of the M_D in the protanope subjects. Only the increment responses (rapid-ON) after
289 isolation of the present cone type were large.

290

291 Insert Figure 5 about here

292

293 DISCUSSION

294

295 Subcortical areas of the visual system, such as the retina (Diller et al. 2004; Lee
296 et al. 2010) and the LGN (Zeki 1973; Derrington et al. 1984; Lennie et al. 1990) are
297 composed of different groups of cells that are differently activated by the retinal
298 photoreceptor types. The L- and M-cone types, for instance, provide principal input to
299 the L/M opponent (through the midget bipolar and midget ganglion cells in the retina

300 and the parvocellular cells in the LGN) and to the luminance (via diffuse bipolar and
301 parasol ganglion cells in the retina and the magnocellular cells in the LGN) pathways.
302 Although subcortical processing of information by these pathways is fairly well
303 understood, it is generally not well understood how signals from the isolated L- and M-
304 cone types are subsequently translated in the visual cortex.

305 In the present study we recorded VEPs while presenting light stimuli that isolate
306 L-cone or M-cone activity to increments (rapid-on) or decrements (rapid-off) of cone
307 excitations. We were able to show that L/M-cone opponency initiated by the
308 photoreceptors in the retina (DeValois & DeValois, 1993), recently recorded in human
309 ERGs using cone isolated stimuli (McKeefry et al., 2014; Kremers et al., 2014; Tsai et
310 al., 2016), and found in visual perception (Giulianini & Eskew, 1998; Sankeralli &
311 Mullen, 2001; Parry et al., 2016), is also measurable using VEP. L_I and M_D cortical
312 responses resemble each other, as do L_D and M_I responses. Moreover, the lack of a
313 photoreceptor type (L or M) leads to a domination of the other photoreceptor type as
314 recorded in the cortical responses in dichromats.

315 The simplest explanation of the similarity of the responses to M- and L-cone
316 sawtooth stimuli of opposite polarity is the involvement of L/M-cone opponency as is
317 found in the parvocellular subcortical pathway. VEP responses probably receive input
318 from parvo- and magnocellular pathways when using luminance stimuli of different
319 contrasts (Rudvin & Valberg, 2006). Thus, it is not unlikely that the VEPs mainly
320 represent parvocellular activity with cone isolating stimuli. Interestingly, the
321 resemblance between L_I and M_D and between L_D and M_I responses in the VEPs is
322 present with full field stimuli. The resemblances in ERGs was clearer when the stimuli
323 were not full field but spatially restricted to the central 70° of the retina (Tsai et al.
324 2016). ERG responses to L- and M-cone isolating stimuli can indeed be explained by a

325 mixture of luminance and chromatic responses. However, when the stimuli are
326 restricted to the central retina the chromatic responses strongly dominate (Tsai et al.,
327 2016). Owing to the cortical magnification of the foveal responses, we can explain why
328 the full field VEPs also are dominated by the chromatic responses.

329 L-cone ERG responses have larger amplitudes compared to the M-cone ERG
330 responses (Kremers et al., 2012; McKeefry et al., 2014; Kremers et al., 2014; Tsai et al.,
331 2014). This may be due the larger number of midrange bipolar cells with direct L-cone
332 inputs (Brainard et al., 2000). This was not observed in the VEPs: L- and M-cone
333 stimulation result in similar amplitude responses only with different polarity. This is
334 expected when the responses are dominated by parvocellular signals, where the L/M
335 ratio is known to be more balanced (Smith et al., 1992; Kremers et al., 1992).

336 The responses to luminance modulation may be explained by an asymmetry in
337 the ON- and OFF-subpathways. In the L/M cone opponent pathway, there are four sub-
338 pathways: +L-M, +M-L, -L+M, -M+L. The ON-/OFF-asymmetry could explain
339 response differences between +L-M and +M-L on the one hand and -L+M and -M+L
340 on the other hand. However, an additional asymmetry between +L-M and +M-L and
341 between -L+M and -M+L must be assumed otherwise their responses would cancel
342 each other out. Which mechanisms are responsible for these signals is an important
343 open question. A possible source of asymmetry may be attributed to the L/M cone ratio.
344 There generally are more L- than M-cones and thus there are probably also more
345 postreceptoral neurons belonging to the +L-M than to +M-L subpathways. Similarly -
346 L+M neurons probably outnumber -M+L neurons. If the answer lies in the relative
347 numerosity of +L-M compared to +M-L cells then it can be expected that the signals as
348 measured in the ERGs are also transmitted to the cortex because the imbalance in cell
349 numbers is possibly also reflected in an imbalance in the numbers of cortical cells.

350 While this may be a sound basis for a proposed model, it is still at a qualitative stage,
351 and further work is needed to consider the many parameters that should be part of a
352 quantitative model (such as L/M ratio as a function of retinal eccentricity; individual
353 differences in L/M ratio; quantitative contributions of the different post-receptoral
354 pathways to mass potentials such as the ERG or the VEP, etc.).

355 We speculate that there is an increasing interaction of the chromatic opponent
356 mechanisms initiated with neural signals from each L- or M- cone in subcortical areas
357 that might be responsible for the non-linearity of the signal at the level of the primary
358 visual cortex. The contribution of the present study is that these observations might be
359 taken into account when modeling the origins of the human VEP.

360 In the primate visual cortex there are different classes of neurons processing
361 specific characteristics of visual information. Similarities and dissimilarities have been
362 noted regarding chromatic-opponent cells in the visual cortex compared to those in the
363 retina and in the LGN. Complex cells (Hubel and Wiesel 1968), color cells (Gouras,
364 1970; Dow and Gouras, 1973; Dow 1974), double-opponent cells (Johnson et al. 2001),
365 and other types of visual cortical cells are considered to be the neurons responsible for
366 chromatic processing. Like the midget bipolar and ganglion cells of the retina (see a
367 review by Lee et al. 2010) and the chromatic cells of the LGN (Wiesel and Hubel 1966;
368 Hubel and Wiesel 1966), these cortical cells receive antagonistic inputs from the
369 different types of photoreceptors. The L/M opponency in VEP signals indicates that the
370 opponent cell responses dominate the VEP responses. This is in agreement with data
371 from functional magnetic resonance imaging (fMRI) where the BOLD signal suggests
372 that the neural activity in the visual cortex is strongly driven by L/M-cone opponent
373 inputs (Engel et al. 1997).

374 In the present study we chose an intermediate temporal frequency of 4 Hz. ERG
375 responses at lower temporal frequencies to L- or to M-cone isolated sawtooth
376 stimulation did not display additional features. L- and/or M-cone stimulation up to
377 about 12 Hz, has been associated with responses driven by chromatic opponent
378 postreceptoral mechanisms (Kremers & Pangeni, 2012). We assumed that the 4 Hz
379 stimulation used in the present study might activate mainly the midget bipolar cells that
380 send their signals to the parvocellular pathway and, subsequently, to the chromatic
381 opponent cells of V1. Furthermore, frequencies below 4 Hz are much more
382 contaminated by lower frequency noise, such as blinks and eye movements that usually
383 happen during the recordings of flicker stimulation (Kremers et al., 2010; Pangeni et al.,
384 2012).

385 The method used here was suitable to record cortical responses using L- and M-
386 cone isolated stimuli in subjects with normal color vision and also in dichromats.
387 Interestingly, the M_I responses in the protanopes and the L_I responses in the
388 deuteranopes were similar to each other (see Figure 5), indicating that these signals are
389 processed similarly in these subjects and are luminance driven (since these subjects lack
390 L/M opponent pathways that is observed in the VEPs of the trichromats). The
391 stimulation of the lacking cone type leads to a negligible response and the decrement
392 responses were smaller (though clearly present in two dichromats). The smaller
393 response to decrement stimulation (OFF-response) of the L-cone isolated stimulus in
394 deuteranope subjects and of the M-cone isolated stimulus in protanope subjects was not
395 detected in the ERG (McKeefry et al., 2014; Kremers et al., 2014), although there the
396 responses are quite different in form (ON-responses are characterized by the presence of
397 an a- and a b-wave, whereas OFF-responses show a d-wave). We believe the cortical
398 interactions might be the cause of suppressing and/canceling the decrement signals.

399 This is also in contrast with psychophysical data where the sensitivity to OFF
400 sawtooth stimuli was larger than to ON stimuli. The specific stimulus conditions (such
401 as mean luminance) have large influence on psychophysical sensitivities to ON and
402 OFF stimuli (Bowen et al. 1989, 1992). Possibly, the measured cortical responses are
403 similarly influenced by mean luminance or other stimulus attributes. ERGs obtained
404 varying the relative contrast show a linear relationship between the contrast and the
405 response amplitudes (they were smaller for lower cone contrast stimuli) and the implicit
406 times were not influenced by the cone contrast. It would be interesting to study in the
407 future if this would also be the case with VEPs using cone isolating stimuli.

408 VEP recording is a non-invasive clinical tool that can be easily and painlessly
409 applied on verbal and non-verbal subjects, even in those with cognitive or motor
410 impairment. However, VEPs show generally inter-individual variability. As stated in the
411 results, we have also found individual variation of the signal that might provide
412 difficulties if used in clinical testing. Despite the inter-individual variability, the stimuli
413 used in the present study provided consistent data. We propose that this protocol can be
414 considered when investigating diseases that affect the visual system. Further
415 investigation concerning the clinical application of the protocol is necessary. For
416 instance, the deuteranopes showed different L_D profile. The next step is to investigate
417 the responses of more dichromats as well as anomalous trichromats.

418

419 ACKNOWLEDGEMENTS

420

421 This work was supported by Bundesministerium für Bildung und Forschung – BMBF
422 (grant number 01DN14009 to JK); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
423 Tecnológico – CNPq (grant numbers 470785/2014-4 and 404239/2016-1 to MTSB,

424 456746/2014-5 to DMOB, and 490428/2013-4 to DFV); Coordenação de
425 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (grant number 3263/2013 to
426 DFV); Deutsche Forschungsgemeinschaft (grant number KR1317/13-1 to JK); and
427 Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (grant numbers 2016/22007-5
428 and 2016/04538-3 to MTSB, 2014/06457-5 to BVN, 2014/25743-9 to EH, and
429 2014/26818-2 to DFV). The authors would like to thank Neil Parry for comments on the
430 manuscript.

431

432 REFERENCES

433 American Clinical Neurophysiology Society (2006) Guideline 5: guidelines for standard
434 electrode position nomenclature. *Journal of Clinical Neurophysiology*, 23:107-
435 110.

436

437 Barboni MTS, Nagy BV, Moura ALA, Damico FM, Costa MF, Kremers J, Ventura DF
438 (2013). ON and OFF electroretinography and contrast sensitivity in Duchenne
439 muscular dystrophy. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 54:3195-
440 3204.

441

442 Bowen RW, Pokorny J, Smith VC (1989). Sawtooth contrast sensitivity: decrements have
443 the edge. *Vision Research*. 29(11):1501-1509.

444

445 Bowen RW, Pokorny J, Smith VC, Fowler MA (1992). Sawtooth contrast sensitivity:
446 effects of mean illuminance and low temporal frequencies. *Vision Research*.
447 32(7):1239-1247.

448

449 Derrington AM, Krauskopf J, Lennie P (1984). Chromatic mechanisms in lateral
 450 geniculate nucleus of macaque. *The Journal of Physiology*. 357:241-65.

451

452 DeValois RL & DeValois KK (1993). A multi-stage color model. *Vision Research*.
 453 33(8):1053-1065.

454

455 Diller L, Packer OS, Verweij J, McMahon MJ, Williams DR, Dacey DM (2004).
 456 L and M cone contributions to the midget and parasol ganglion cell receptive
 457 fields of macaque monkey retina. *Journal of Neuroscience*. 24(5):1079-88.

458

459 Dow BM and Gouras P (1973). Color and spatial specificity of single units in Rhesus
 460 monkey foveal striate cortex. *Journal of Neurophysiology*. 36(1):79-100.

461

462 Dow BM (1974). Functional classes of cells and their laminar distribution in monkey
 463 visual cortex. *Journal of Neurophysiology*. 37(5):927-46.

464

465 Engel S, Zhang X, Wandell B (1997). Colour tuning in human visual cortex measured
 466 with functional magnetic resonance imaging. *Nature*. 388(6637):68-71.

467

468 Estévez O and Spekreijse H (1974). A spectral compensation method for determining
 469 the flicker characteristics of the human colour mechanisms. *Vision Research*.
 470 14:823-830.

471

472 Estévez O and Spekreijse H. (1982). The "silent substitution" method in visual research.
 473 *Vision Research*. 22:681-691.

474

475 Giulianini F & Eskew RT (1998). Chromatic masking in the (δ L/L, δ M/M)

476 plane of cone-contrast space reveals only two detection mechanism. Vision

477 Research. 38(24):3913-3926.

478

479 Gouras P (1970). Trichromatic mechanisms in single cortical neurons.

480 Science. 168(3930):489-92.

481

482 Hall TA (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and

483 analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series (41):

484 95–98.

485

486 Hubel DH and Wiesel TN (1966). Effects of varying stimulus size and color on single

487 lateral geniculate cells in Rhesus monkeys. Proc Natl Acad Sci U S

488 A. 55(6):1345-1346.

489

490 Hubel DH and Wiesel TN (1968). Receptive fields and functional architecture of

491 monkey striate cortex. The Journal of Physiology. 195:215-243.

492

493 Jacob MM, Pangeni G, Gomes BD, Souza GS, Silva Filho M, Silveira LCL, Maguire J,

494 Parry NR, McKeefry DJ, Kremers J (2015). The spatial properties of L- and M-

495 cone inputs to electroretinograms that reflect different types of post-receptoral

496 processing. Plos One 10: e0121218.

497

498 Johnson EN, Hawken MJ, Shapley R. (2001). The spatial transformation of color in the
 499 primary visual cortex of the macaque monkey. *Nature Neuroscience*. 4:409–416.
 500

501 Kaneko A. (1973). Receptive field organization of bipolar and amacrine cells in the
 502 goldfish retina. *The Journal of Physiology*. 235:133-153.
 503

504 Kremers J (2003). The assessment of L- and M-cone specific electroretinographical
 505 signals in the normal and abnormal retina. *Prog Retin Eye Res* 22:579-605.
 506

507 Kremers J, Lee B, Kaiser PK (1992). Sensitivity of macaque retinal ganglion cells and
 508 human observers to combined luminance and chromatic temporal modulation.
 509 *Journal of the Optical Society of America. A, Optics and Image Science*.
 510 9(9):1477-1485.
 511

512 Kremers J, Pangeni G, Tsaousis KT, McKeefry D, Murray IJ, Parry NR (2014).
 513 Incremental and decremental L- and M-cone driven ERG responses: II. Sawtooth
 514 stimulation. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis*. 31(4):A170-8.
 515

516 Kremers J, Rodrigues AR, Silveira LC, da Silva-Filho M (2010). Flicker ERGs
 517 representing chromaticity and luminance signals. *Investigative Ophthalmology &*
 518 *Visual Science*. 51(1):577-587.
 519

520 Lee BB, Martin PR, Grünert U (2010). Retinal connectivity and primate vision. *Prog*
 521 *Retin Eye Res*. 29(6):622-39.
 522

523 Lennie P, Krauskopf J, Sclar G (1990). Chromatic mechanisms in striate cortex of
524 macaque. *Journal of Neuroscience*. 10(2):649-69.
525

526 Maguire J, Parry NRA, Kremers J, Kommanapali D, Murray IJ, McKeefry DJ. (2016).
527 Rod electroretinograms elicited by silent substitution stimuli from the light-
528 adapted human eye. *TVST* 5(4):13.
529

530 McKeefry D, Kremers J, Kommanapalli D, Challa NK, Murray IJ, Maguire J, Parry
531 NRA (2014). Incremental and decremental L- and M-cone driven ERG responses:
532 I. Square-wave pulse stimulation. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis*.
533 31(4):A159-A169.
534

535 Neitz M and Neitz J. (1995). Numbers and ratios of visual pigment genes for normal
536 red-green color vision. *Science*. 267(5200):1013-6.
537

538 Neitz M, Carroll J, Renner A, Knau H, Werner JS, Neitz J (2004). Variety of genotypes
539 in males diagnosed as dichromatic on a conventional clinical anomaloscope.
540 *Visual Neuroscience*. 21(3):205-16.
541

542 Pangeni G, Lämmer R, Tornow RP, Horn FK, Kremers J. (2012). On- and off-response
543 ERGs elicited by sawtooth stimuli in normal subjects and glaucoma patients. *Doc*
544 *Ophthalmol*. 124(3):237-48.
545

546 Parry NR, McKeefry DJ, Kremers J, Murray IJ (2016). A dim view of M-cone onsets. J
547 Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis. 33(3):A207-13.
548

549 Regan BC, Reffin JP, Mollon JD (1994). Luminance noise and the rapid determination
550 of discrimination ellipses in colour deficiency. Vision Research. 34(10):1279-99.
551

552 Rudvin I & Valberg A (2006). Flicker VEPs reflecting multiple rod and cone pathways.
553 Vision Research. 46(5):699-717.
554

555 Sankeralli MJ & Mullen KT (2001). Bipolar or rectified chromatic detection
556 mechanisms? Visual Neuroscience. 18(1):127-135.
557

558 Smith VC, Lee BB, Pokorny J, Martin PR, Valberg A (1992). Responses of macaque
559 ganglion cells to the relative phase of heterochromatically modulated lights.
560 Journal of Physiology. 458:191-221.
561

562 Tsai TI, Jacob MM, McKeefry D, Murray IJ, Parry NR, Kremers J (2016). Spatial
563 properties of L- and M-cone driven incremental (On-) and decremental (Off-)
564 electroretinograms: evidence for the involvement of multiple post-receptoral
565 mechanisms. J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis. 33(3):A1-11.
566

567 Werblin FS, Dowling JE. (1969). Organization of the retina of the Mudpuppy,
568 *Necturus maculosus*. II. Intracellular recording. Journal of Neurophysiology.
569 32:339-355.
570

571 Wiesel TN, Hubel DH (1966). Spatial and chromatic interactions in the lateral
572 geniculate body of the rhesus monkey. The Journal Neurophysiology. 29(6):1115-
573 1156.

574

575 Zeki SM (1973). Colour coding in rhesus monkey prestriate cortex. Brain
576 Research. 53(2):422-427.

577

578

579

580

581

582

583

584

585

586

587

588

589

590

591

592

593

594

595

596

597

598

599

600 TABLE 1

601

602 Table 1. Demographic information of the population showing age and the result of the
 603 Cambridge Colour Test (CCT) considered to classify the subjects.

604

Subject		Age	CCT*		
			Protan	Deutan	Tritan
1	Control	16	29	29	38
2	Control	14	52	61	69
3	Control	26	33	33	40
4	Control	27	29	30	65
5	Control	13	49	33	90
6	Control	13	73	71	79
7	Control	13	36	46	62
8	Control	13	37	46	52
9	Control	29	41	29	52
10	Control	27	36	26	53
11	Control	27	42	29	54
12	Control	25	39	30	69
AVE		20	41	39	60
St dev		7	12	14	15
13	deuteranope	39	325	953	68
14	protanope	21	752	99	45
15	deuteranope	33	282	469	78
16	protanope	23	658	184	64

605

606 *CCT = psychophysical computerized test that allows to estimate color discrimination
 607 thresholds along the protan, deutan and tritan axes from a central achromatic point in
 608 the CIE 1976 u'v' color space. Results are given as the 10^4 x distance between the

609 chromaticity of the threshold and the central point (chromaticity of the background;
610 Reffin & Mollon, 1994).

611

612

613

614 TABLE 2

615 Table 2. Characteristics of the four LEDs used and the light stimulation for each
616 protocol

LED	Peak wavelength (nm)	Full width at half maximum	Mean luminance (cd/m ²) * / contrast (%)		Modulation profile			
			L-cone isolation**	M-cone isolation**	L	Lo	Ml	Mb
Red	638	± 9	80 / 90	80 / 90	Rapid-ON	Rapid-OFF	Rapid-OFF	Rapid-ON
Green	523	± 19	40 / 7	40 / 23	Rapid-ON	Rapid-OFF	Rapid-OFF	Rapid-ON
Blue	469	± 11	4 / 1	4 / 2	Rapid-OFF	Rapid-ON	Rapid-ON	Rapid-OFF
Amber	594	± 8	160 / 25	160 / 60	Rapid-OFF	Rapid-ON	Rapid-ON	Rapid-OFF

617

618 *Total mean luminance (284 cd/m²) and mean chromaticity (x = 0.5686, y = 0.3716;

619 CIE 1931 color space) were the same for all four stimulus condition; **L- and M-

620 isolation provided 18% and 17% of modulation contrasts, respectively.

TABLE 3

Table 3. Statistic comparison between the sums of the squared distances

t-test	LI-MD	MI-LD	LI-MI	LD-MD
LI-MD	-	0.29	0.03	0.05
MI-LD		-	0.0008	0.02
LI-MI			-	0.27
LD-MD				-
AVE	200	172	362	457
STDEV	150	175	258	513

AVE = average (in μV^2); STDEV = standard deviation; grey = p considered as significant.

CAPTIONS TO FIGURES

Figure 1. Averaged ($\pm$ one standard deviation; shaded area) responses ($N = 12$) to four stimulus cycles obtained for each protocol, as well as the sum of the average signals (right column).

Figure 2. Signals of two typical subjects (upper and middle rows). The average signals of 12 healthy subjects for each cone-isolated condition (L_I , L_D , M_I , and M_D) are shown below. Red-thicker traces represent the L-cone and green-thinner traces the M-cone isolated responses (continuous = increment and dotted = decrement). The black bold traces represent the squared distances between the two signals at each instant. A and B show the comparison between increment and decrement responses driven by the same cone type. In the middle, the L_I with M_D (C) and L_D with M_I (D) are compared. The last two columns are the comparisons between L- and M-increments (E) and L- and M-decrements (F). The upper scale is related to the individual signals. The lower scales are related to the average signals (upper) and to the squared distance (lower).

Figure 3. Comparisons between amplitudes (upper graphs) and phases (lower graphs) of 1st harmonic response components. The correlations are shown for the comparison of L_I x L_D (left graphs), M_I x M_D (right graphs), and of L_I x M_D (2nd column) and L_D x M_I (3rd column). The enclosed area indicates significant correlations: L_I x M_D (Pearson's $r = 0.8$; $p = 0.002$) and L_D x M_I (Pearson's $r = 0.7$; $p = 0.02$) response amplitudes, and L_D x M_I (Pearson's $r = 0.9$; $p = 0.001$) response phases.

Figure 4. Comparisons between amplitudes (upper graphs) and phases (lower graphs) of 2nd harmonic response components. The correlations are shown for the comparison of L_I x M_D (left graphs), M_I x M_D (right graphs), and of L_I x M_D (middle-left graphs) and L_D x M_I (middle-right graphs). The enclosed graphs show significant correlations: L_I x M_D (Pearson's $r = 0.6$; $p = 0.03$) and L_D x M_I (Pearson's $r = 0.8$; $p = 0.004$) response amplitudes, and L_D x M_I (Pearson's $r = 0.9$; $p < 0.001$) response phases.

Figure 5. Average responses of the control group ($N = 12$; upper traces) and individual responses of two deuteranopic (middle traces) and two protanopic (lower traces) subjects. In the dichromatic subjects responses to stimulation of the lacking cone type leads to a relatively negligible response. Moreover, they displayed mainly increment responses of the preserved cone type: the deuteranopic subjects showed higher L_I responses compared with the L_D responses and the protanopic subjects displayed normal M_I responses and reduced M_D responses.

			CCT*		
Subject		Age	Protan	Deutan	Tritan
1	Control	16	29	29	38
2	Control	14	52	61	69
3	Control	26	33	33	40
4	Control	27	29	30	65
5	Control	13	49	33	90
6	Control	13	73	71	79
7	Control	13	36	46	62
8	Control	13	37	46	52
9	Control	29	41	29	52
10	Control	27	36	26	53
11	Control	27	42	29	54
12	Control	25	39	30	69
AVE		20	41	39	60
St dev		7	12	14	15
13	deuteranope	39	325	953	68
14	protanope	21	752	99	45
15	deuteranope	33	282	469	78
16	protanope	23	658	184	64

LED	Peak wavelength (nm)	Full width at half maximum
Red	638	± 9
Green	523	± 19
Blue	469	± 11
Amber	594	± 8

Mean luminance (cd/m ²)* / contrast (%)			Modulation profile	
L-cone isolation**	M-cone isolation**	L _I	L _D	M _I
80 / 90	80 / 90	Rapid-ON	Rapid-OFF	Rapid-OFF
40 / 7	40 / 23	Rapid-ON	Rapid-OFF	Rapid-OFF
4 / 1	4 / 2	Rapid-OFF	Rapid-ON	Rapid-ON
160 / 25	160 / 60	Rapid-OFF	Rapid-ON	Rapid-ON

Md
Rapid-ON
Rapid-ON
Rapid-OFF
Rapid-OFF

t-test	LI-MD	MI-LD	LI-MI	LD-MD
LI-MD	-	0.29	0.03	0.05
MI-LD		-	0.0008	0.02
LI-MI			-	0.27
LD-MD				-
AVE	200	172	362	457
STDEV	150	175	258	513

L_I

L_D

10 μ V
200 ms

$L_I + L_D$

M_I

M_D

$M_I + M_D$

First harmonic

Amplitude (μV)

Second harmonic

Amplitude (μV)

L_I/M_D

L_D/M_I

Controls

— L-cone isolated stimulation
— M-cone isolated stimulation

Deuteranopes

4 μV
50 ms

Protanopes

ANEXO 5 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Desenvolvimento e aplicação de métodos eletrorretinográficos e psicofísicos para avaliação de mecanismos ON e OFF nas vias visuais de luminância e de oponência cromática na Diabetes Mellitus e na distrofia muscular de Duchenne

Professora Titular Dora Fix Ventura (responsável pelo setor), Professor Doutor Marcelo Fernandes da Costa, Professora Doutora Mirella Gualtieri, Doutora Mirella Telles Salgueiro Barboni, Cristiane Maria Gomes Martins

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 Diabetes Mellitus e pela distrofia muscular de Duchenne. O estudo, baseado nos resultados dos exames, será realizado no Laboratório de Eletrofisiologia e Psicofísica Visual Clínica do Departamento de Psicologia Experimental do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo. Os exames não são invasivos e não oferecem riscos de dano físico e/ou psicológico ao participante.

Será realizada uma consulta completa com médico (a) oftalmologista para verificar se há alterações oculares decorrentes de algum problema oftalmológico que não esteja relacionado com a Diabetes Mellitus ou com a distrofia muscular de Duchenne.

No exame de eletrorretinograma colírios serão pingados para dilatação da pupila, além de realizada uma adaptação ao escuro de 30 minutos. Durante o exame você ficará sentado em frente a um monitor de computador ou uma cúpula redonda, aparecerão imagens quadriculadas ou luzes piscando para estimular a retina e verificar o seu funcionamento. Um eletrodo será posicionado sobre a córnea, ou logo abaixo dela na pálpebra inferior. Para evitar desconforto durante esse exame será feita anestesia prévia da córnea com uso de colírio anestésico.

Nos exames psicofísicos algumas imagens quadradas (coloridas ou preta e branca) serão apresentadas em monitor de computador em sala totalmente escurecida, você ficará sentado em frente ao monitor e deverá responder, verbalmente ou através de uma caixa de controle, quando 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.

Os exames poderão ser realizados no mesmo dia ou em dias diferentes com sessões mais curtas. Toda avaliação dura aproximadamente quatro horas.

Sendo voluntário para este estudo:

- Você fica livre para esclarecer quaisquer dúvidas sobre este estudo antes e durante o curso da pesquisa.

Rubrica Pesquisador

Rubrica Sujeito

Universidade de São Paulo
Instituto de Psicologia
Departamento de Psicologia Experimental

Setor de Eletrofisiologia e Psicofísica Visual Clínica

- 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.
- 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.

A principal investigadora é *Profª Drª Dora Fix Ventura*, que pode ser encontrada no endereço – Av: Profº Mello Moraes, 1721 - Cidade Universitária. Telefone(s) 11-3091 4263.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da USP (CEP-HU) no endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 2565 – Cidade Universitária – CEP: 05508-000 – São Paulo – SP - Telefone: 3091-9457 – Fax: 3091-9452 - Email: cep@hu.usp.br.

Caso seja detectado no sujeito que está sendo selecionado algum problema de saúde previamente ao início da pesquisa, ele será encaminhado ao Sistema Único de Saúde (SUS) para tratamento. Se houver intercorrência de saúde com o sujeito participante decorrente da pesquisa, este será atendido no HU/USP segundo o critério de assistência do mesmo (hospital de atendimento secundário). Se houver necessidade de atendimento de maior complexidade, o pesquisador deverá encaminhá-lo ao SUS.

“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 Diabetes Mellitus e pela distrofia muscular de Duchenne e autorizo a utilização dos resultados dos meus exames para a análise dos dados e divulgação no resultado da pesquisa”.

Rubrica Pesquisador

Rubrica Sujeito

Assinatura do Participante ou Responsável

Assinatura do Pesquisador

Nome do Participante: _____

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

Endereço: _____

Bairro: _____ Cidade: _____ Estado: _____

CEP: _____ Telefones: _____

Nome do Responsável: _____

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

São Paulo, _____ de _____ de _____

Rubrica Pesquisador

Rubrica Sujeito

ANEXO 6 – Parecer Comitê de Ética

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - HU/USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Desenvolvimento e aplicação de métodos eletroretinográficos e psicofísicos para avaliação de mecanismos ON e OFF nas vias visuais de luminância e de oponência cromática na Diabetes Mellitus e na distrofia muscular de Duchenne

Pesquisador: Dora Selma Fix Ventura

Área Temática: Área 9. A critério do CEP.

Versão: 2

CAAE: 02822312.5.0000.0076

Instituição Proponente: INSTITUTO DE PSICOLOGIA ((USP))

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 156.826

Data da Relatoria: 19/10/2012

Apresentação do Projeto:

Pesquisa de grupo com larga experiência em avaliação eletrofisiológica visual, destinada a avaliação de pacientes portadores de Diabetes Mellitus e distrofia Muscular de Duchenne

Objetivo da Pesquisa:

Trata-se de pesquisa destinada a avaliar mecanismos ON e OFF das vias visuais de luminância e cromáticas em pacientes portadores de diabetes mellitus e Distrofia Muscular de Duchenne, através de técnicas eletrofisiológicas e psicofísicas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos previstos e o benefício a ser obtido refere-se a avaliação oftalmológica dos pacientes

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de pesquisa relevante para a área de conhecimento a que se destina, e poderá trazer novas informações sobre a evolução da doença nos grupos de pacientes portadores das patologias a serem avaliadas.

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2565

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11-)3091-9457

Fax: (11-)3091-9452

E-mail: cep@hu.usp.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - HU/USP

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O Termo de Consentimento Livre e pós esclarecimento é claro, e foi reformulado a partir das considerações do Colegiado.

Recomendações:

Já foram feitas as modificações solicitadas no TCLE.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após a reformulação o Termo de consentimento encontra-se adequado, atendendo às resoluções do Conselho Nacional de Saúde.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Já foram feitas as modificações solicitadas no TCLE, assim o projeto está APROVADO.

SAO PAULO, 28 de Novembro de 2012

Assinador por:
Mauricio Seckler
(Coordenador)

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2565

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11-)3091-9457

Fax: (11-)3091-9452

E-mail: cep@hu.usp.br