DIEGO VINICIUS LOPES DECLEVA

*Avaliação funcional do sistema visual de pacientes com
Degeneração Macular Relacionada à Idade*

**São Paulo
2019**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE PSICOLOGIA
NEUROCIÊNCIAS E COMPORTAMENTO

*Avaliação funcional do sistema visual de pacientes com
Degeneração Macular Relacionada à Idade*

Versão Corrigida

Diego Vinicius Lopes Decleva

Tese apresentada à Universidade de São Paulo,
como parte das exigências para obtenção do título
de **Doutor** em ciências no programa de
Neurociências e Comportamento

Orientação: Prof.^a Dr.^a Dora Fix Ventura

Coorientação: Dr.^a Kallene Summer Moreira Vidal

São Paulo
2019

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

Catologação na publicação
Biblioteca Dante Moreira Leite
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo
Dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Decleva, Diego Vinicius Lopes

"Avaliação funcional do sistema visual de pacientes com Degeneração Macular Relacionada à Idade" / Diego Vinicius Lopes Decleva; orientadora Dora Selma Fix Ventura; co-orientadora Kallene Summer Moreira Vidal. -- São Paulo, 2019.

130 f.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento) -- Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, 2019.

1. Degeneração Macular Relacionada à Idade (DMRI). 2. Visão de Cores. 3. Reflexo Pupilar à Luz. 4. Eletroretinograma (ERG). 5. Célula Ganglionar Intrinsecamente Fotossensível (ipRGC). I. Ventura, Dora Selma Fix, orient. II. Vidal, Kallene Summer Moreira, co-orient. III. Título.

Diego Decleva

***Avaliação funcional do sistema visual de pacientes com
Degeneração Macular Relacionada à Idade***

BANCA EXAMINADORA

Prof.ª Dr.ª Dora Fix Ventura
Orientadora

Prof.º Dr. Marcelo Fernandes da Costa

Prof.º Dr. Givago Silva Souza

Dr. Francisco Max Damico

Dr. Ronaldo Yuiti Sano

Dra. Cristiane Maria Gomes Martins

São Paulo, 26 de julho de 2019

Dedico

À minha família,

Aos meus pais Rosemeire e Decleva, meus maiores exemplos de amor e dedicação,

Ao meu irmão Douglas, por quem eu me esforço para ser cada vez melhor,

À minha avó Nadir, por todo carinho e cuidado,

A vocês, por estarem comigo durante todos estes anos, chorando minhas lágrimas e sorrindo meus sorrisos e, acima de tudo, pelo apoio incondicional.

Sem vocês nada disso teria sido possível!

“Senhor, fiz o melhor que pude com as ferramentas que me deste.

Deste-me um cérebro para pensar com ceticismo, e eu o usei. Deste-me a capacidade de raciocínio, e eu apliquei a todas as alegações, incluindo a de tua existência.

Deste-me um senso moral, e senti as dores da culpa e as alegrias do orgulho pelas escolhas más e boas que escolhi fazer.

Tentei fazer aos outros o que gostaria que eles me fizessem, e, embora tenha sentido falta desse ideal muitas e muitas vezes, tentei praticar teu princípio fundamental sempre que pude.

Seja qual for a natureza de tua imortal, infinita e espiritual essência, sendo eu um ser mortal, finito e corpóreo, não sou capaz de compreendê-la, apesar de todo o meu esforço e, portanto, seja feita a tua vontade”

Michael Shermer

Cérebro e Crença (2012)

Agradecimentos

À Professora Dra. Dora Ventura, por toda orientação que me deu nesta jornada e pela confiança em mim depositada. Foi um privilégio e uma inspiração tê-la como minha orientadora nesta jornada acadêmica.

À Dra. Kallene Vidal, por todo apoio e pelas oportunidades que me proporcionou durante este período, pelas discussões científicas sempre produtivas, também pelas risadas e histórias, mas, acima de tudo, pelo companheirismo durante estes anos.

Aos amigos do Laboratório de Psicofísica e Eletrofisiologia Visual, Professora Daniela Bonci, Einat Hauzman, André Liber, Ricardo Tiosso, Aline Goto, Felipe Galante, Kae Leopoldo, Vitor Corredor, Luiz Baran, Luíse Garcia, Guido Bittencourt, Maria Júlia Vilani, Juliana Tanashiro, Diego Lima, Leonardo Silva, Heydi Tabares, Sarah Dias e aos alunos de apoio técnico Lucas Guiral e Tércilla Alves, por compartilharem comigo essa grande parte da minha vida. Sempre levarei vocês em meu coração!

Aos médicos oftalmologistas da Prevent Senior pelo auxílio na triagem dos pacientes.

Ao Dr. André Kreutz pela ajuda com as análises dos OCTs.

As técnicas, enfermeiras e auxiliares, pelo respeito e pela ajuda sempre disposta.

Ao Paulo Hidalgo, chefe do setor de oftalmologia, por abrir as portas do instituto para a realização esta pesquisa.

Aos chefes do Núcleo de Neurociências e Comportamento, do qual tive o prazer e orgulho de ser representante discente por estes anos, Marcelo Fernandes da Costa e Miriam Garcia Mijares, por todo apoio e respeito e por me apresentar aos bastidores da pós-graduação.

Aos participantes voluntários, que foram essenciais para a realização deste objetivo e terão sempre minha gratidão.

E a Deus, por ter me proporcionado esta experiência sensacional, por ter me dado forças para continuar e por ter suavizado minha jornada através das incríveis pessoas citadas acima.

Resumo

Declewa, D. (2019). Avaliação funcional do sistema visual de pacientes com Degeneração Macular Relacionada à Idade. (Tese de Doutorado). Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A Degeneração Macular Relacionada à Idade (DMRI) é a principal causa de cegueira e perda de visão central em pessoas acima dos 50 anos nos países desenvolvidos. O diagnóstico da DMRI é geralmente realizado em consulta de rotina na qual, através da biomicroscopia de fundo, é detectada a presença de drusas, exsudatos subretinianos ou atrofia geográfica na retina. Embora o diagnóstico seja razoavelmente simples, sua fisiopatologia é complexa, não está totalmente elucidada e envolve os sistemas antioxidante, imune e vascular, afetando principalmente a mácula, área responsável pela acuidade visual e visão de cores. Assim, nosso objetivo foi avaliar a atividade dos fotorreceptores em pacientes com DMRI através de testes psicofísicos e eletrofisiológicos. Para isto, foram incluídos 49 participantes, 19 no grupo controle ($71,6 \pm 4,8$ anos) e 30 no grupo com DMRI seca ($69,2 \pm 7,7$ anos). Os participantes foram submetidos a teste de visão de cores (Cambridge Colour Test - CCT), a pupilometria cromática para verificar a integridade da retina externa e interna e eletrorretinografia (ERG) com *flicker* heterocromático. Os resultados obtidos no CCT apresentaram uma pior discriminação de cores nos eixos Protan, Deutan e Tritan dos sujeitos portadores de DMRI comparados com os controles. Na pupilometria cromática, constatamos integridade da retina externa, mas houve redução da amplitude da resposta do estímulo às células ipRGC da retina interna. No ERG, não foram observadas diferenças nas respostas correspondentes a atividade das vias magno- e parvocelular. Estes resultados indicam que há preservação de função das vias magno- e parvocelulares na DMRI inicial, assim como das respostas pupilares mediadas pelos fotorreceptores, e que a discriminação de cores pode ser um instrumento sensível para revelar alterações iniciais na DMRI.

Palavras chave: Degeneração Macular Relacionada à Idade (DMRI); Visão de Cores (CCT); Reflexo Pupilar à Luz; Eletrorretinograma (ERG); Células Ganglionares Intrinsecamente Fotossensíveis (ipRGC);

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Abstract

Declewa, D. (2019). Functional assessment of the visual system of patients with Age-Related Macular Degeneration. (Doctoral thesis). Institute of Psychology, University of São Paulo, São Paulo.

Age Related Macular Degeneration (AMD) is the leading cause of blindness and loss of central vision in people over 50 in developed countries. The AMD diagnosis is usually performed in a routine examination in which the presence of drusen, subretinal exudates or geographic atrophy in the retina is detected through background biomicroscopy. Although the diagnosis is simple, its pathophysiology is complex, not fully elucidated and involves the antioxidant, immune and vascular systems, mainly affecting the macula, region responsible for visual acuity and color vision. Thus, our objective was to evaluate the photoreceptor activity in patients with AMD through psychophysical and electrophysiological tests. For this, 49 participants were included, 19 in the control group (71.6 ± 4.8 years) and 30 in the dry AMD group (69.2 ± 7.7 years). Participants underwent color vision test (Cambridge Colour Test - CCT), chromatic pupillometry to verify the integrity of the external and internal retina, and electroretinography (ERG) with heterochromatic flicker. The results in the CCT showed worse color discrimination in the Protan, Deutan and Tritan axes of subjects with AMD compared to controls. The Tritan results is positively correlated to alteration on EPR-Bruch's membrane. In chromatic pupillometry, we observed external retinal integrity, but there was a reduction in the response amplitude of the stimulus to ipRGC cells of the internal retina. On ERG, no differences were observed between the groups in the activity of the magno- and parvocellular pathways. These results indicate preservation of magno- and parvocellular pathways function in initial AMD, as well as photoreceptors-mediated pupillary responses, and that color discrimination might a sensitive instrument to reveal initial changes in AMD.

Keywords: Age-Related Macular Degeneration (AMD); color vision (CCT); Pupillary Light Reflex; Electroretinogram (ERG); Intrinsically Photosensitive Ganglion Cells (ipRGC)

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. MORFOLOGIA DOS CONES E BASTONETES _____	17
FIGURA 2. DENSIDADE DE CONES E BASTONETES EM RELAÇÃO A EXCENTRICIDADE NA RETINA _____	18
FIGURA 3. ORGANIZAÇÃO DA RETINA E LOCALIZAÇÃO DAS DRUSAS _____	25
FIGURA 4. DRUSAS OBSERVADAS EM BIOMOCROSCOPIA DE FUNDO _____	25
FIGURA 5. FOTOGRAFIA DO FUNDO DE OLHO _____	29
FIGURA 6. ESQUEMA DE UMA RETINA COM DMRI SECA _____	30
FIGURA 7. DIAGRAMA DE UMA RETINA COM DMRI EXSUDATIVA CLÁSSICA _____	31
FIGURA 8. DIAGRAMA DE UMA RETINA COM ATROFIA GEOGRÁFICA _____	32
FIGURA 9. EXEMPLO DE UMA TOMOGRAFIA DE COERÊNCIA ÓPTICA DE OLHO NORMAL _____	34
FIGURA 10. FUNDO DE OLHO E OCT CORRESPONDENTE EM CASO DE DMRI SECA _____	35
FIGURA 11. FUNDO DE OLHO E OCT CORRESPONDENTE EM CASO DE DMRI EXSUDATIVA _____	36
FIGURA 12. FUNDO DE OLHO E OCT CORRESPONDENTE EM CASO DE DMRI ATRÓFICA _____	37
FIGURA 13. GRADE DE AMSLER _____	39
FIGURA 14. RELAÇÃO ENTRE OS FATORES DO ENVELHECIMENTO E DMRI _____	47
FIGURA 15. EXEMPLO DO ESTÍMULO USADO PARA AVALIAÇÃO DA DISCRIMINAÇÃO CROMÁTICA NO TESTE CAMBRIDGE COLOUR TEST (CCT) _____	50
FIGURA 16. RESUMO DAS VIAS MAGNO, PARVO E CONIOCELULAR _____	53
FIGURA 17. VIAS ENVOLVIDAS NO REFLEXO PUPILAR _____	54
FIGURA 18. VIAS ENVOLVIDAS NA DILATAÇÃO PUPILAR _____	55
FIGURA 19. EXEMPLO DO ESTÍMULO APRESENTADO NO CCT _____	65
FIGURA 20. DIAGRAMA DO ESPAÇO DE CROMATICIDADE DA CIE 1976 (U'V') E OS EIXOS AVALIADOS NO PROTOCOLO TRIVECTOR DO CAMBRIDGE COLOUR TEST (CCT) _____	66
FIGURA 21. EXEMPLO DE MEDIÇÃO AUTOMÁTICA DO TAMANHO PUPILAR _____	67
FIGURA 22. OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS DA PUPILOMETRIA _____	68
FIGURA 23. ESTÍMULOS DO PROTOCOLO DE FLICKER HETEROCROMÁTICO E AS SUAS CARACTERÍSTICAS _____	70
FIGURA 24. REPRESENTAÇÃO DA MODULAÇÃO DE CONTRASTE ENTRE O ESTÍMULO VERMELHO (R) E O VERDE (G) _____	71
FIGURA 25. LIMIAR DE DISCRIMINAÇÃO CROMÁTICA PARA OS EIXOS PROTAN, DEUTAN E TRITAN AVALIADOS NO CAMBRIDGE COLOUR TEST (CCT) NO PROTOCOLO TRIVECTOR _____	80
FIGURA 26. RESPOSTA PUPILAR MEDIADA POR BASTONETES _____	87
FIGURA 27. RESPOSTA PUPILAR MEDIADA POR CONES _____	88

FIGURA 28. EXEMPLO DE RESPOSTA DE MESMA INTENSIDADE E COMPRIMENTO DE ONDA DIFERENTE NA ATIVIDADE DAS IPRGCS NO REFLEXO PUPILAR _____	89
FIGURA 29. RESPOSTA PUPILAR MEDIADA POR IPRGCS _____	90
FIGURA 30. LINHA DE BASE ENTRE CONTROLES E DMRI _____	91
FIGURA 31. LATÊNCIA PARA O PICO DA CONSTRIÇÃO PUPILAR PARA A RESPOSTA DOS FOTORRECEPTORES _____	92
FIGURA 32. AMPLITUDE DA CONSTRIÇÃO PUPILAR PARA OS ESTÍMULOS PARA BASTONETE, CONE E IPRGC _____	93
FIGURA 33. TEMPO PARA RECUPERAÇÃO DE 75% DO DIÂMETRO PUPILAR DE BASE _____	95
FIGURA 34. RESPOSTA SUSTENTADA _____	96
FIGURA 35. MÉDIA DA AMPLITUDE DO 1º HARMÔNICO EM 12 HZ PARA OS GRUPOS CONTROLE E DMRI _____	98
FIGURA 36. MÉDIA DA FASE DA RESPOSTA DO 1º HARMÔNICO DA FREQUÊNCIA TEMPORAL DE 12 HZ _____	99
FIGURA 37. MÉDIA DA AMPLITUDE DO 2º HARMÔNICO DA FREQUÊNCIA DE 12 HZ PARA OS GRUPOS CONTROLE E DMRI _____	100
FIGURA 38. MÉDIA DA AMPLITUDE DO 1º HARMÔNICO DA FREQUÊNCIA DE 36 HZ PARA OS GRUPOS CONTROLE E DMRI _____	101
FIGURA 39. MÉDIA DA FASE DO 1º HARMÔNICO DA FREQUÊNCIA TEMPORAL DE 36 HZ _____	102

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. CLASSIFICAÇÃO DA DMRI DE ACORDO COM AREDS (2000)	28
TABELA 2. TABELA DE DADOS DEMOGRÁFICOS POR GRUPO COM MÉDIA E DESVIO PADRÃO DA ESPESSURA E VOLUME CÚBICO	75
TABELA 3. VALORES INDIVIDUAIS DOS PARÂMETROS AVALIADOS PELO OCT	76
TABELA 4. RESULTADOS INDIVIDUAIS PARA A DISCRIMINAÇÃO CROMÁTICA NOS EIXOS PROTAN, DEUTAN E TRITAN AVALIADOS PELO CAMBRIDGE COLOUR TEST (CCT)	81
TABELA 5. RESUMO DOS TRABALHOS COM VISÃO DE CORES EM PACIENTES COM DMRI	85

LISTA DE ABREVIATURAS

AREDS	<i>Age-related eye disease study</i>
CAD	<i>Color Assessment and Diagnosis</i>
CAT	Catalase
Ccl-2	Proteína 1-químioatraente de monócitos
Ccr-2	Receptor-2 de quimiocina
CCT	<i>Cambridge colour test</i>
CGL	Corpo geniculado lateral
CNTF	Fator neurotrófico ciliar
DHA	Ácido docosahexaenóico
DMRI	Degeneração Macular Relacionada à Idade
EEG	Eletroencefalograma
EMD	Edema macular diabético
ERG	Eletrorretinografia
FGF	Fatores de crescimento de fibroblastos
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione
GSSG	Glutathione oxidada
HFP	Fotometria de <i>flicker</i> heterocromático
Hz	Hertz
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IgG	Imunoglobulina G
ipRGC	Células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis
LEDGF	Fator de crescimento celular derivado do cristalino
mg	Miligrama
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
nm	Nanômetro
NO	Óxido nítrico
OCT	<i>Optical coherence tomography</i>
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PEDF	Fator derivado do epitélio pigmentado
PI3k	Fosfatidilinositol 3-quinase
PKB	Proteína quinase B
RNA	Ácido ribonucleico
siRNA	Interferente pequeno do Ácido ribonucléico
SOD	Superóxido dismutase
TCLE	Termo de consentimento livre esclarecido
TGF-β	Fator de transformação do crescimento β
UI	Unidade Internacional
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR1	<i>FMS-like tyrosine kinase, FLT-1</i>
VEGFR2	<i>Kinase insert domain-containing receptor</i>
VEGFR3	<i>FMS-like tyrosine kinase 4</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. FOTORRECEPTORES	16
1.2. DEGENERAÇÃO MACULAR RELACIONADA A IDADE (DMRI)	22
1.2.1. EPIDEMIOLOGIA	22
1.2.2. DIAGNÓSTICO	24
1.2.3. FATORES DE RISCO	40
1.2.4. FISIOPATOLOGIA	43
1.3. AVALIAÇÃO FUNCIONAL DOS FOTORRECEPTORES	49
1.4. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	57
2. OBJETIVOS	59
3. MATERIAL E MÉTODOS	61
3.1. PARTICIPANTES	62
3.2. VISÃO DE CORES	64
3.3. REFLEXO PUPILAR À LUZ	66
3.4. ELETRORRETINOGRAMA (ERG)	69
3.1. TOMOGRAFIA DE COERÊNCIA ÓPTICA (OCT)	72
3.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA	73
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
4.1. PACIENTES	75
4.2. VISÃO DE CORES	80
4.3. REFLEXO PUPILAR À LUZ	87
4.4. ELETRORRETINOGRAMA (ERG)	98
5. CONCLUSÕES	104
6. BIBLIOGRAFIA	106
7. APÊNDICES	125

1. INTRODUÇÃO

1.1. Fotorreceptores

Os fotorreceptores são os neurônios que convertem a energia luminosa em sinais elétricos. Há dois tipos clássicos de fotorreceptores, os cones e bastonetes, bem como um fotorreceptor descoberto recentemente, que é uma célula ganglionar fotossensível chamada célula ganglionar intrinsecamente fotossensível, ipRGC (do inglês, *intrinsically photosensitive retinal ganglion cells*). Os cones e bastonetes estão envolvidos na decodificação da cena visual, enquanto as ipRGCs também participam de outras funções não formadoras de imagem (Maynard *et al.*, 2015).

Cones e bastonetes possuem a mesma estrutura básica (**Figura 1**); sendo compostos por um segmento externo, cuja extremidade está em contato com o epitélio pigmentado da retina, um segmento interno, onde se encontra o núcleo da célula e as organelas responsáveis pela formação de ATP e pela síntese proteica, e um segmento basal, com um terminal sináptico que libera glutamato para as células bipolares (Krebs *et al.*, 2013).

Apesar da sua similaridade morfológica, esses fotorreceptores apresentam propriedades funcionais distintas. Os bastonetes apresentam uma resposta mais lenta, o que leva a uma maior integração temporal (He & MacLeod, 2000). A amplificação do sinal é consideravelmente maior nos bastonetes que nos cones. Porém, os bastonetes apresentam um limiar de saturação, que nos cones é praticamente inexistente. Outra propriedade distinta entre esses dois fotorreceptores é com relação a suas vias de convergência, os bastonetes apresentam alta convergência para os neurônios de segunda ordem (células horizontais e bipolares), resultando em maior integração espacial que os cones. Os cones, por sua vez, apresentam maior acuidade, resultado da excentricidade de sua integração espacial, bem como maior número de pigmentos fotossensíveis (opsinas), proporcionando a visão de cores (Kolb, 2012).

Os cones e bastonetes também diferem nos fotopigmentos que contém. Os bastonetes possuem um pigmento fotossensível chamado rodopsina. O cromóforo da rodopsina é o 11-*cis*-retinal (vitamina A). Esse cromóforo liga-se à opsina para formar o complexo binário rodopsina. Já os fotopigmentos existentes nos cones são chamados de iodopsinas. Os cones possuem iodopsinas, que combinadas com o retinal formam três pigmentos distintos, um sensível ao azul, outro ao verde e outro ao vermelho. Assim temos cones sensíveis a cada uma destas cores (Imamoto & Shichida, 2014).

Figura 1. Morfologia dos cones e bastonetes. Os cones e os bastonetes apresentam a mesma estrutura básica, sendo compostos por um segmento externo, onde se localizam os discos e os pigmentos fotossensíveis e cuja extremidade está em contato com o epitélio pigmentado da retina, um segmento interno, onde se encontra as principais organelas da célula (Adaptado de Silverthorn, 2016).

Os bastonetes funcionam na presença de pouca luz e tem maior participação na visão escotópica, já os cones tem maior participação na visão fotópica. Os bastonetes são mais numerosos que os cones, em uma proporção de 20:1, exceto na fóvea central, onde se encontram apenas cones (**Figura 2**; Krebs *et al.*, 2013).

Figura 2. Densidade de cones e bastonetes em relação a excentricidade na retina. A densidade de bastonetes é muito superior à dos cones na periferia da retina. Por outro lado, a concentração de cone na retina central, principalmente na fóvea onde há apenas os cones (Adaptado de Krebs *et al.*, 2013).

Os cones são os responsáveis pela acuidade visual e pela visão de cores, portanto, tendo maior participação na visão fotópica. A visão de cor é a capacidade de perceber, dentro dos limites, o conteúdo de um comprimento de onda da luz emitida por uma fonte luminosa ou refletida por uma superfície iluminada (Kremers *et al.*, 2016).

Fisiologicamente, precisamos de dois fatores fundamentais para que possamos perceber as cores. O primeiro fator é a necessidade de ao menos dois tipos de cones com absorções espectrais diferentes. Os humanos normalmente apresentam três tipos de cones com diferentes sensibilidades espectrais, os cones S, M o L (Neitz & Neitz, 2011). Essas diferenças encontram-se nos aminoácidos que compõem o retinal, levando assim, a alterações na sensibilidade espectral desta proteína (Imamoto & Shichida, 2014). Os cones tipo S detectam fótons de alta frequência e têm sua absorção máxima no azul ($\lambda_{\text{máx}}$ 415 - 430 nm). Esses cones constituem apenas cerca de 5 % de todos os cones da retina e estão localizados sobretudo na periferia da

retina (Siegel & Saprú, 2006). Os cones tipo M detectam fótons de frequência média e têm uma absorção máxima no espectro verde ($\lambda_{\text{máx}}$ 530 - 537 nm). Os cones tipo L são o tipo mais abundante na retina e detectam fótons de baixa frequência, com absorção máxima no espectro vermelho ($\lambda_{\text{máx}}$ 555-565 nm). Todas as cores percebidas podem ser obtidas através da mistura das respostas desses três cones.

O segundo fator fundamental para a visão de cores diz respeito ao processamento pós-receptor, mecanismos estes que determinam e comparam as excitações relativas dos cones, realizados pela maquinaria pós-receptor do sistema visual (Kremers *et al.*, 2016). Há evidências que sugerem que o processamento da informação espectral da cena visual é conduzido através de 2 subsistemas de visão de cores que são filogeneticamente distintos. O primeiro, e mais antigo, compara as capturas quânticas nos cones S com os cones M ou L. Acredita-se que o segundo subsistema, mais recente, tenha surgido inicialmente como um sistema especializado em resolução espacial (Simunovic, 2016).

O terceiro tipo de fotorreceptor descrito foram as células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis (ipRGCs). Este tipo celular é uma subpopulação rara das células ganglionares, constituindo cerca de 0,4 a 1,5 % do total de células ganglionares (La Morgia *et al.*, 2010; Liao *et al.*, 2016), que respondem à luz na ausência de qualquer sinal dos cones ou bastonetes (Pickard & Sollars, 2011; Graham & Wong, 2016) e que tem sua maior concentração ao redor da fóvea (La Morgia *et al.*, 2010). A presença dessas células ganglionares fotorreceptoras não havia sido estabelecida até que, em 2000, Provencio e colaboradores demonstraram a expressão de um novo fotopigmento em células ganglionares, a melanopsina (Provencio *et al.*, 2000). Descoberta esta que teve impacto revolucionário na cronobiologia (Lazzerini Ospri *et al.*, 2017). Até pouco tempo, acreditava-se que as ipRGCs não participavam do processo visual (Wong, 2009; Sexton *et al.*, 2012), contudo, através da técnica de ressonância magnética, um estudo recente mostrou que, as ipRGCs contribuem para a percepção visual humana no processamento espacial (Allen *et al.*, 2019), temporal, cromático (Zelevansky *et al.*, 2018b) e também para a discriminação de brilho (Brown *et al.*, 2012; Graham & Wong, 2016; Zelevansky *et al.*, 2018a), postulando que este tipo celular possa ser um novo fotorreceptor do processamento visual (Spitschan *et al.*, 2017).

As ipRGCs apresentam propriedades muito diferentes dos fotorreceptores clássicos como, por exemplo, a resposta à luz das ipRGCs difere drasticamente das respostas dos

bastonetes e cones. A polaridade da resposta à luz das ipRGCs é despolarizante, enquanto que estímulos nos bastonetes e cones apresentam resposta hiperpolarizante. Além disso, ipRGCs são muito menos sensíveis à luz do que os fotorreceptores clássicos, e sinalizam com cinética muito mais lenta (Do *et al.*, 2009). Outra diferença encontrada nas ipRGCs é o seu espectro de absorção, devido à utilização de melanopsina como seu fotopigmento, as ipRGCs possuem sensibilidade espectral em torno de 480 nm (Dacey *et al.*, 2005; Markwell *et al.*, 2010).

Embora tenham sido descritas há não muito tempo, 5 classes de ipRGCs já foram descritas, são chamadas de M1–5. Esses subtipos diferem em tamanho, estratificação dendrítica, em suas características eletrofisiológicas, bem como suas regiões de projeção no cérebro (Schmidt *et al.*, 2011a, 2011b). O subtipo M1 foi o primeiro a ser caracterizado. Eles são os menores em tamanho celular e seus dendritos estratificam na camada plexiforme interna, também apresenta a maior concentração de melanopsina e, consequentemente, a maior sensibilidade à luz. Já os subtipos M2, M4 e M5, são maiores que o M1, e o M4 é o maior subtipo. Estes subtipos estratificam para a subcamada interna da camada plexiforme interna e têm menor sensibilidade à luz. O subtipo M3 se diferencia pela sua ramificação dendrítica, estratificando para as duas subcamadas da camada plexiforme interna (Schmidt & Kofuji, 2009; Schmidt *et al.*, 2011a, 2011b). Nos humanos, foram identificados os subtipos M1 e M2 (Liao *et al.*, 2016).

As células ipRGCs participam de funções importantes, como na constrição pupilar, regulação neuroendócrina e sincronização ritmos fisiológicos diários (circadianos) (Maynard *et al.*, 2015; Graham & Wong, 2016). A participação das ipRGCs no ritmo circadiano ficou comprovada após estudos que demonstraram que camundongos nocautes para cones e bastonetes apresentam resposta circadiana normal (Paul *et al.*, 2009). Outro estudo mostrou a perda dessas células durante o envelhecimento, o que pode auxiliar na explicação das alterações de ritmo circadiano em pessoas da terceira idade (La Morgia *et al.*, 2010).

Estudos mostram uma alteração na resposta das ipRGCs em pacientes no estágio inicial na doença de Parkinson, mesmo sem a apresentação de alterações oftálmicas clinicamente observáveis (Zaffer *et al.*, 2015; Joyce *et al.*, 2018).

Na doença de Alzheimer, foi evidenciada a perda significativa de ipRGCs em análise post-mortem, com alterações morfológicas e tamanhos dendríticos anormais. Montagens planas

das retinas mostraram acúmulo de placa β -amilóide dentro e ao redor das ipRGCs. Nesses mesmos pacientes, também houve alteração do ritmo circadiano, bem como uma redução na eficiência do sono (La Morgia *et al.*, 2016).

Estudos demonstraram a presença de α -sinucleína na retina interna de paciente com doença de Parkinson (Beach *et al.*, 2014). A marcação da sinucleína fosforilada na retina desses pacientes revelou um acúmulo em células ganglionares grandes e com extensa árvore dendrítica, similar às ipRGCs (La Morgia *et al.*, 2017). Assim, a hipótese é que a α -sinucleína esteja afetando as ipRGCs, o que levaria a disfunção circadiana em pacientes com a doença de Parkinson. Porém, esta hipótese ainda precisa ser elucidada.

Em modelos animais da doença de Huntington, um estudo mostrou a redução da expressão da melanopsina antes do aparecimento dos déficits motores. O mesmo estudo apresentou ainda que o subtipo M1 é susceptível à toxicidade causada pela mutação de Huntington. O comprometimento resultante do subtipo M1 das ipRGCs contribuiu para a degeneração precoce da via ipRGC-núcleo supraquiasmático, levando a alteração circadiana durante a progressão da doença de Huntington (Lin *et al.*, 2019).

Por outro lado, em neuropatias ópticas mitocondriais, como a doença de Leber e a Atrofia Óptica Dominante, que afetam seletivamente células ganglionares, causando perda visual importante, porém com preservação relativa do reflexo pupilar à luz, foi demonstrada uma relativa preservação das ipRGCs, em comparação a perda massiva das células ganglionares totais, mesmo nas áreas mais afetadas. Esses resultados demonstram que as ipRGCs resistem à neurodegeneração devido à disfunção mitocondrial e mantêm funções oculares não formadoras de imagem nesses pacientes com deficiência visual (Moura *et al.*, 2013). Esses resultados provêm uma explicação para a preservação do reflexo pupilar à luz apesar da perda visual, revelando a robustez das ipRGCs frente a um dano metabólico. Contudo, seu mecanismo de proteção ainda precisa ser elucidado (La Morgia *et al.*, 2010).

1.2. Degeneração Macular Relacionada a Idade (DMRI)

A Degeneração Macular Relacionada à Idade (DMRI), como o próprio nome sugere, é uma doença degenerativa e progressiva da mácula, área central da retina responsável pela acuidade visual e pela visão de cores, que afeta pessoas com mais de 50 anos (van Lookeren Campagne *et al.*, 2014)

A descoberta da DMRI começa em 1782, quando foi descrita uma “mancha amarela” no centro da retina, o pigmento macular que posteriormente passou a ser chamado mácula ou *macula lútea* (do latim *macula*, "ponto" + *lútea*, "amarelo") e que, na década de 80, teve sua composição química determinada como sendo composta, principalmente, por dois diidroxicarotenóides, a luteína e a zeoxantina, e é o objeto principal das observações e estudo da DMRI. Entretanto, foi após mais de 100 anos da identificação da mácula, em 1875, que os primeiros registros sobre uma alteração macular relacionada à idade foram publicados. Estes registros apresentaram a DMRI como uma “doença coroidoretiniana central e simétrica que ocorre em pessoas senis” (Ding *et al.*, 2009 apud Hutchison and Tay, 1875).

Embora muito tempo tenha se passado desde sua identificação inicial, a definição da DMRI ainda é uma tarefa bastante complexa uma vez que ainda não se sabe ao certo sua etiologia, contudo, atualmente ela é definida como sendo um acometimento degenerativo macular tardio, aparecendo em fundo geneticamente predeterminado, cuja expressão clínica é a função de fatores ambientais adicionais (Soubrane, 2009).

1.2.1. Epidemiologia

A DMRI é a principal causa de cegueira e perda de visão central em países desenvolvidos, sendo estimado que a DMRI afete cerca de 10 % das pessoas acima de 65 anos e mais de 25 % em pessoas acima dos 75 anos (Ratnapriya & Chew, 2013; Wong *et al.*, 2014; Al-Zamil & Yassin, 2017). Estima-se que, apenas nos Estados Unidos, 8 milhões apresentem a forma inicial e intermediária da doença e que a forma mais grave da DMRI afete cerca de 2 milhões de pessoas (van Lookeren Campagne *et al.*, 2014).

Em Portugal, um estudo mostrou diferença na prevalência da DMRI inicial e avançada de 6,99 e 0,67 % em cidades costeiras e de 5,39 e 1,29 % em cidades do interior, porém as

razões para estas diferenças não estão claras. A prevalência ajustada por idade e sexo para a população portuguesa foi de 12,4 %, sendo 1,1 % de casos intermediários, 0,5 % de casos avançados (neovascularização) e 0,6% de casos que apresentaram atrofia geográfica (Cachulo *et al.*, 2016). Outro estudo apresentou que 7,2 % da população irlandesa acima dos 50 anos apresenta alguma forma da DMRI, sendo estimado que 6,6 % apresente a forma inicial e 0,6 % a forma avançada da doença (Akuffo *et al.*, 2015). No Reino Unido, por sua vez, um estudo encontrou incidência de 15,6 % da forma inicial, 2,5 % de atrofia geográfica e 1,8 % de casos com DMRI avançada (Wilde *et al.*, 2017).

Um estudo com mais de 42 mil participantes de 14 coortes em 10 países da Europa apresentou que 3,5 % dos participantes até 60 anos apresentaram o quadro inicial da DMRI, enquanto este valor foi de 17,6 % em maiores de 85 anos. Já o quadro avançado apresentou incidência de 0,1 % e 9,8 % para os mesmos grupos de participantes. A estimativa para 2040 é que o número de pessoas com DMRI na fase inicial esteja entre 15 e 21 milhões e na fase mais grave entre 4 e 5 milhões (Colijn *et al.*, 2017).

Já na Índia, um estudo encontrou uma diferença de prevalência entre a população do Leste e do Oeste do país de 1,4 e 3,1 % respectivamente. Foi observada também maior incidência nas regiões rurais em comparação às regiões urbanas de 2,3 e 2,1 %, respectivamente. O estudo trouxe também uma diferença entre os sexos, sendo a mulher 0,6 % mais afetada pela doença (Likhar *et al.*, 2015). Outro estudo com 6617 pacientes do sul da Índia, maiores de 60 anos, também comparou a prevalência da DMRI na população rural e urbana e encontrou números bem diferentes do artigo anterior, com a prevalência da DMRI inicial chegando a 20,9 % dos pacientes da área rural e 16,3 % da área urbana, enquanto que a DMRI exsudativa foi observada em 2,2 e 2,3 %, respectivamente (Raman *et al.*, 2016).

No Brasil, a principal causa de cegueira ainda é a catarata (Arieta *et al.*, 2003; Salomão *et al.*, 2008). Um estudo realizado em Pernambuco, região nordeste do Brasil, mostrou que a prevalência da DMRI em pacientes com mais de 50 anos varia entre 23 e 30 % (Santos *et al.*, 2005). Já na região sudeste do Brasil, outro estudo indicou que alterações retinianas são responsáveis por 35,3 % das causas de cegueira e por 20,3 % das causas de baixa acuidade visual (Salomão *et al.*, 2008), contudo, sem identificar quais alterações retinianas foram as principais responsáveis por estes números. Na mesma região, outro estudo identificou a DMRI como responsável por 5,4 % dos casos de alterações visuais (Arieta *et al.*, 2003). Um estudo

realizado com idosos japoneses e descendentes no Paraná, região sul do país, apresentou incidência de 15,1 % de DMRI em pessoas com mais de 60 anos, sendo que 13,8 % apresentaram o estado inicial, 0,8 % o estado avançado e 0,4 % o quadro de atrofia geográfica (Oguido *et al.*, 2008).

Embora alguns trabalhos tenham sido realizados sobre a epidemiologia, faltam trabalhos sobre a prevalência da DMRI de uma forma geral no país, portanto, a incidência da doença pode estar subestimada. Além disto, a prospecção é que o número de portadores da doença aumente em 50 % até 2020 (Chou *et al.*, 2016).

1.2.2. Diagnóstico

Frequentemente o diagnóstico da DMRI inicia-se com uma consulta de rotina ao oftalmologista já que os estágios iniciais não apresentam sintomas. Embora as funções visuais estejam preservadas na DMRI inicial, queixas como sensação de nevoeiro ou incômodo na visão, modificações na visão de cores, retardo na adaptação ao escuro e/ou leves alterações na percepção de estímulos paralelos são comuns (Soubrane, 2009).

1.2.2.1. Biomicroscopia de fundo

O exame mais importante para a diagnóstico e acompanhamento da DMRI, certamente, é a biomicroscopia de fundo, que tem a função de avaliar as estruturas do fundo de olho (nervo óptico e retina central), através de um biomicroscópio, mais conhecido como lâmpada de fenda. Neste exame, busca-se o principal indício da DMRI, as drusas (Williams *et al.*, 2009; Buschini *et al.*, 2011). As drusas são detritos polimorfos de material extracelular depositados entre a membrana basal das células do epitélio pigmentar da retina (EPR) e a zona colagenosa interna da membrana de Bruch (**Figura 3**; Jager *et al.*, 2008).

Figura 3. Organização da retina e localização das drusas. (A) Organização da retina normal, sem depósito de drusa. (B) Localização do depósito de drusa, entre a camada do epitélio pigmentado da retina e a membrana de Bruch (Adaptado de van Lookeren Campagne et al., 2014).

Esses depósitos são identificados na biomicroscopia como lesões pálidas, amareladas que variam em tamanho e forma e podem ter aparência cristalina devido à calcificação (**Figura 4**) (Besharse & Bok, 2011; Buschini *et al.*, 2011).

Figura 4. Drusas observadas em biomicroscopia de fundo. A seta azul indica drusas encontradas na mácula (círculo amarelo) e a seta verde, drusas encontradas fora da mácula (Adaptado de Williams *et al.*, 2009).

As drusas foram inicialmente identificadas por Wedl em 1864 como sendo “corpos coloides da coróide” (de Jong, 2016 apud Wedl, 1854; De Jong, 2018). Embora muito tempo tenha se passado após sua primeira descrição, ainda tem havido debate, principalmente nas últimas quatro décadas, em torno dos mecanismos moleculares de formação das drusas (Besharse & Bok, 2011). No entanto, se as drusas se formam a partir de fragmentos de células do epitélio pigmentado da retina, de material anormal secretado por células do epitélio pigmentado disfuncionais, ou se alguns componentes vêm dos coriocapilares, a composição das drusas nos dá informações importantes sobre a patogênese da DMRI.

Inicialmente, a composição das drusas foi descrita como sendo lipídio e carboidrato (Farkas *et al.*, 1971). Porém, mais recentemente, foi mostrado que sua composição também inclui elementos de fontes intra mas, principalmente, extra-oculares. Ubiquitina, integrinas, lipoproteínas, inibidor tecidual da metaloproteinase 3, produtos finais de glicação avançada, β -amilóide, fibronectina, clusterina e vitronectina foram identificados na composição das drusas (Besharse & Bok, 2011; Buschini *et al.*, 2011). Produtos de origem extra-ocular incluem componentes β -amilóides, apolipoproteína E, fator X, cadeias λ de imunoglobulina, componentes do Complemento como C1q, C3, C5 e C5b-9, componente amiloide P (Zarbin, 2004; Besharse & Bok, 2011), antígenos do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC, do inglês, *Major Histocompatibility Complex*) classe II (Johnson *et al.*, 2000), cofactor de membrana (CD46), receptor de complemento 1 e fator de complemento H (CFH) (Besharse & Bok, 2011). Os componentes celulares são principalmente derivados do epitélio pigmentado e consistem em organelas, fragmentos de lâmina celular e basal, lipofuscina e melanina (Ishibashi *et al.*, 1986). A presença do antígeno leucocitário humano DR (HLA-DR) e do cluster de antígenos de diferenciação (CD) foi recentemente descrita (Hageman *et al.*, 2001).

Assim, parece pouco provável que as drusas sejam apenas resíduos celulares não eliminados, mas também o subproduto de processos ativos que envolvem inflamação, o sistema do complemento e mecanismos imunes locais e sistêmicos (Hageman *et al.*, 2001).

Os diversos mecanismos moleculares de formação e composição das drusas podem dar origem a diferentes tipos de drusas. Os tipos de drusas e sua descrição e classificação começou com Gass fazendo a relação anatomo-clínica em 1972 (Gass, 1972).

Atualmente, as drusas podem ser classificadas de acordo com sua composição e aparência no exame fundoscópico em alguns tipos: Drusas miliares, observadas com cor branca-amarelada, de formato arredondado, puntiformes com contorno bem definido e com diâmetro inferior a 63 µm. Drusas serosas são observadas como depósitos amarelados, de formato ovalado ou policíclico, de contorno menos evidente, às vezes contornado com halo avermelhado, de tamanho maior que 125 µm. Drusas regressivas, aparecem como pequenas formações de formato variável e de bordas nítidas, com aspecto brilhante e refringente. As drusas regressivas ou calcificadas, estão associadas a placas de atrofia no epitélio pigmentado, constituindo uma forma particular de regressão. Drusas membranosas, por sua vez, são observadas apenas após os 65 anos de idade, como pequenas formações de contorno mal definido, de cor amarela pálida e localização exclusivamente macular. Pelo fato de serem pequenas e de poderem coexistir com outras formas de drusas, são difíceis de serem identificadas. Por último, as drusas reticuladas, são chamadas também de drusas azuis, uma vez que são melhores observadas sob luz azul. Drusas reticuladas são observadas em forma de labirinto amarelado e de aspecto cerebriforme. Este tipo de drusa está relacionado ao aparecimento de neovasos coroides (Abdelsalam *et al.*, 1999; Lim, 2007; Soubrane, 2009; Buschini *et al.*, 2011).

As drusas assemelham-se aos depósitos extracelulares encontrados na doença de Alzheimer, amiloidose e aterosclerose (Kauppinen *et al.*, 2016). No grupo de pacientes com Alzheimer, a prevalência de DMRI foi maior que a esperada. Estes resultados são compatíveis com resultados laboratoriais da presença de β -amiloide tanto nas drusas quanto no Alzheimer, sugerindo que a DMRI e o Alzheimer compartilhem algumas vias patogênicas (Baumritter *et al.*, 2007).

Embora muito avanço tenha sido realizado na elucidação dos mecanismos moleculares de formação e composição através de diversas técnicas, ainda não está claro se as drusas promovem a DMRI ou simplesmente representam um de seus epifenômenos clínicos (Rudolf *et al.*, 2008).

A biomicroscopia é uma ferramenta importante na classificação das diferentes formas da DMRI. A classificação epidemiológica, usando a classificação de Wisconsin (Klein *et al.*, 2014), na maioria dos casos, diferencia apenas entre DMRI Inicial, que é quando o paciente apresenta drusas maiores que 125 µm de diâmetro ou pseudodrusas retinianas ou anormalidades

pigmentares e DMRI Avançada, na qual o paciente apresenta neovascularização ou atrofia geográfica (Klein *et al.*, 2014; Mitchell *et al.*, 2018).

Contudo, a classificação mais utilizada é a do AREDS (sigla do inglês, *Age-Related Eye Disease Study* um grande estudo clínico, patrocinado pelo *National Eye Institute*, um instituto do *National Institutes of Health* (NIH) do governo federal estadunidense, projetado para descobrir mais sobre a história natural e fatores de risco da DMRI e catarata. Assim, o AREDS classificou a DMRI em 4 categorias, de acordo com achados maculares, conforme apresentado na **Tabela 1** (AREDS, 2000).

Tabela 1. Classificação da DMRI de acordo com AREDS (2000).

Categoria	Classificação	Descrição
1	Normal	0 – 5 drusas pequenas (< 63 µm de diâmetro)
2	Inicial	Múltiplas drusas pequenas ou poucas drusas de tamanho intermediário (63 – 124 µm de diâmetro) ou alteração pigmentar.
3	Intermediária	Diversas drusas intermediárias ou, ao menos, uma drusa grande (> 124 µm de diâmetro)
4	Avançada	Atrofia geográfica no centro da fóvea ou qualquer evidência de neovascularização coroidal, como hemorragia subretiniana, descolamentos de retina serosa ou do epitélio pigmentado, exsudatos lipídicos ou cicatrizes fibrovasculares.

Contudo, na prática clínica, a classificação torna-se um pouco mais simples, uma vez que a conduta médica muda apenas entre DMRI seca (não-exsudativa), exsudativa ou neovascular e atrófica. Assim, a classificação utilizada na rotina oftalmológica classifica como DMRI seca, os casos que incluem a classificação 2 e 3 do AREDS, DMRI exsudativa, quando há evidência de neovascularização ou exsudatos retinianos e DMRI atrófica (atrofia geográfica) (Al-Zamil & Yassin, 2017).

A DMRI seca (**Figura 5b**) é detectada através da identificação de algumas drusas. Na DMRI neovascular (**Figura 5c**), a biomicroscopia de fundo revela uma área de hemorragia através de uma mancha vermelha mais escura. Já a DMRI atrófica (**Figura 5d**), pode ser observada como uma região na qual suas bordas são levemente hiperpigmentadas no nível do

epitélio pigmentado e ocasionalmente hiperfluorescentes, sugerindo que essas células podem conter excesso de lipofusцина. É importante observar que as áreas do epitélio pigmentado hiperfluorescente localizadas na borda da atrofia representam áreas do epitélio pigmentado que estão em risco de morte celular e, conseqüentemente, do aumento de atrofia geográfica (Ho & Regillo, 2011).

Figura 5. Fotografia do fundo de olho. Observação fundoscópica em pacientes normais (A), com DMRI seca (B), com DMRI neovascular (C), e com atrofia geográfica (D). É possível observar o nervo óptico (em inglês, *optic nerve*), as drusas (em inglês, *drusen*) a hemorragia macular (em inglês, *hemorrhage*) e a atrofia geográfica (em inglês, *atrophy*) (Besharse & Bok, 2011).

Dependendo das características histopatológicas, a DMRI pode ser dividida em várias categorias. Na DMRI inicial e intermediária, as drusas interrompem a função de barreira da membrana de Bruch e dificultam a capacidade do epitélio pigmentado de transportar resíduos através da membrana de Bruch. O coriocapilar é menos denso em pacientes com DMRI inicial

ou intermediária. A inflamação na retina externa é evidente pela presença de células ativas da microglia (**Figura 3B**) (van Lookeren Campagne *et al.*, 2014).

A DMRI inicial e intermediária são geralmente referenciadas como DMRI seca, enquanto a forma neovascular da DMRI é conhecida como exsudativa.

Figura 6. Esquema de uma retina com DMRI seca. Na DMRI seca, as drusas interrompem a função de barreira da membrana de Bruch e dificultam a capacidade do epitélio pigmentado de transportar resíduos através da membrana de Bruch. A inflamação na retina externa é evidente pela presença de células ativas da microglia (Adaptado de van Lookeren Campagne *et al.*, 2014).

Muitos dos portadores da forma intermediária da DMRI evoluem para o estágio avançado, que inclui neovascularização (**Figura 7**) e atrofia geográfica (**Figura 8**) (van Lookeren Campagne *et al.*, 2014). No estágio da neovascularização, há o rompimento da membrana de Bruch pelos neovasos que crescem do coriocapilar. Os fluidos liberados dos neovasos com vazamento se acumulam sob o epitélio pigmentado no espaço sub-retiniano, distorcendo a estrutura local e causando estresse nas células do epitélio pigmentado e nos fotorreceptores (van Lookeren Campagne *et al.*, 2014).

Figura 7. Diagrama de uma retina com DMRI exsudativa clássica. Neste estágio, há o rompimento da membrana de Bruch pelos neovasos que crescem do coriocapilar. Os fluidos liberados dos neovasos com vazamento se acumulam sob o epitélio pigmentado no espaço sub-retiniano, distorcendo a estrutura local e causando estresse nas células do epitélio pigmentado e nos fotorreceptores (Adaptado de van Lookeren Campagne *et al.*, 2014).

Já na atrofia geográfica (**Figura 8**), a membrana de Bruch é severamente interrompida; há grande atrofia e perda de células do epitélio pigmentado fotorreceptoras e também perda de outros tipos de células da retina, incluindo células horizontais, células bipolares e células amácrinas. Sinais de inflamação como microglia ativada e macrófagos são evidentes na área degenerada (van Lookeren Campagne *et al.*, 2014).

Figura 8. Diagrama de uma retina com atrofia geográfica. Nesse estágio avançado da DMRI, a membrana de Bruch é severamente interrompida; existe atrofia e perda pronunciada das células do epitélio pigmentado e dos fotorreceptores; perda de outros tipos de células da retina, incluindo células horizontais, células bipolares e células amácrinas são evidentes; o coriocapilar é pouco perfundido; e inflamação é proeminente como microglia ativada e macrófagos são abundantes na área degenerada (Adaptado de van Lookeren Campagne *et al.*, 2014).

1.2.2.2. Tomografia de Coerência Óptica

A tomografia de coerência ótica mas conhecida pela sigla inglês OCT (do inglês, *Optical Coherence Tomography*) tem se tornado uma técnica cada vez mais importante no diagnóstico, classificação e acompanhamento dos pacientes com DMRI (Garcia-Layana *et al.*, 2017; von der Burchard *et al.*, 2018). Esta técnica permite a aquisição de imagens transversais da retina com resolução semi-histológica. Isto permite definir a localização e a natureza das alterações na retina e estruturas adjacentes, bem como avaliar objetivamente a espessura da retina e suas camadas e das outras estruturas.

Quando um feixe de luz coerente é projetado na retina, a luz atravessa as camadas transparentes, é parcialmente espalhada e é então refletida pela interface vitreoretiniana e pelas

várias camadas da retina e coróide, permitindo a aquisição de imagens. A fonte de luz é geralmente um diodo superluminescente com um feixe parcialmente coerente composto de fótons propagados em uma linha reta na forma de uma frente de onda. Este feixe sofre alterações à medida que atravessa os vários meios biológicos: desvio de seu caminho (fenômeno de refração) e absorção parcial e um certo grau de dispersão (quando o meio é heterogêneo). No entanto, a maior parte da luz é refletida na direção inversa ao feixe incidente. Esses feixes refletidos são registrados durante a OCT (Coscas, 2009).

Dessa forma, o princípio da OCT baseia-se na presença de uma interferência parcial entre o feixe de luz refletido pela retina e o outro feixe refletido por um espelho de referência. A combinação de uma frente de onda de vários feixes de luz coerentes induz fenômenos de interferência com amplitudes que são canceladas ou adicionadas, resultando na formação das margens da interferência (Coscas, 2009).

O vítreo transmite luz sem refletir e é representado em preto nas imagens da OCT (**Figura 9**). A hialóide posterior geralmente é indistinguível da superfície da retina, exceto quando o vítreo posterior é destacado e aparece como uma faixa pouco reflexiva. Os coriocapilares e a coróide são camadas altamente refletivas, porque são vasculares e limitam a penetração da luz nas camadas mais profundas. Os vasos sanguíneos são identificados pela sua alta refletividade e pelo efeito de mascaramento gerado nos tecidos adjacentes (Garcia-Layana *et al.*, 2017).

Figura 9. Exemplo de uma tomografia de coerência óptica de olho normal. (A) Anatomia morfológica da fóvea. (B) OCT de mácula normal com as diferentes camadas da retina. ELM (do inglês, *external limiting membrane*): membrana limitante externa; GCL (do inglês, *ganglion cell layer*): camada de células ganglionares; ILM / NFL (do inglês, *internal limiting membrane / nerve fiber layer*): membrana limitante interna / camada de fibra nervosa; INL (do inglês, *inner nuclear layer*): camada nuclear interna; IPL (do inglês, *inner plexiform layer*): camada plexiforme interna; OPL (do inglês, *outer plexiform layer*): camada plexiforme externa; IS PR (do inglês, *inner segments of photoreceptors*) segmentos internos de fotorreceptores (segmentos hióide e elipsóide); ONL (do inglês, *outer nuclear layer*): camada nuclear externa; OS PR (do inglês, *photoreceptor's outer segments*): os segmentos externos dos fotorreceptores; RPE/choriocapillaris (do inglês, *retinal pigment epithelium and choriocapillaris complex*): epitélio pigmentado da retina e complexo coriocapilar; Choroid: coróide; (Arevalo *et al.*, 2013).

No OCT as estruturas retinianas apresentam padrões de refletividade bem definidos. A hiperrefletividade está relacionada à camada de fibra nervosa, mais espessa na porção nasal, epitélio pigmentado e coriocapilar. A apresentação de refletividade normal está relacionada à camada plexiforme interna e externa, camadas nucleares interna e externa. Já a hiporrefletividade está relacionada à camada de fotorreceptores (Garcia-Layana *et al.*, 2017). Dessa forma, podemos observar alterações nessas estruturas de acordo com a morfologia do tecido e sua reflexividade.

Na DMRI seca, as drusas são vistas como ondulações e elevações na faixa hiperrefletiva do epitélio pigmentado, com menos material refletivo abaixo delas, enquanto as camadas internas da retina geralmente permanecem intactas (**Figura 10**) (Garcia-Layana *et al.*, 2017).

Figura 10. Fundo de olho e OCT correspondente em caso de DMRI seca. (A) Imagem da biomicroscopia de fundo com DMRI inicial, com drusas pequenas e pouco numerosas na mácula. (B) OCT da retina do olho observado em (A). Nota-se algumas poucas elevações do epitélio pigmentado na região foveal (setas vermelhas). (C) Imagem da biomicroscopia de fundo com DMRI intermediária, com drusas grandes e numerosas na região extra macular e macular. (D) OCT da retina do olho observado em (C). Nota-se grandes elevações (setas verdes) e irregularidades no epitélio pigmentado (Adaptado de Garcia-Layana *et al.*, 2017).

Na DMRI exsudativa o edema retiniano aparece na OCT como áreas hiperrefletivas em contato com ou na frente do epitélio pigmentado (**Figura 11**). Este edema está sempre presente em alguma extensão na frente da membrana ativa. A neovascularização é menos evidente algumas semanas após o início, e apenas a interrupção, a quebra e o pronunciado espessamento do epitélio pigmentado podem ser vistos (Garcia-Layana *et al.*, 2017).

Figura 11. Fundo de olho e OCT correspondente em caso de DMRE exsudativa. (A) Imagem da biomicroscopia de fundo com DMRE exsudativa clássica. (B) OCT da retina do olho observado em (A). Observa-se uma região de hiporeflexividade (seta vermelha) na área foveal indicando a presença de líquido subretiniano (Adaptado de Lim, 2007).

Existem algoritmos automatizados para a interpretação do OCT em pacientes com DMRE exsudativa que estão baseados na detecção dessas áreas hiporepletivas. No entanto, a detecção de fluidos em si e sua correta interpretação limitam a precisão do diagnóstico. A detecção de fluido sem caracterização adicional não é suficiente para o monitoramento da DMRE. Nesse sentido, um estudo realizado por von der Burchard *et al*, (2018) identificou que o volume macular da retina oferece um bom potencial para preencher essa lacuna de diagnóstico e pode se tornar um importante marcador de monitoramento, elevando a acurácia e a sensibilidade do diagnóstico, quando combinado com a detecção do fluido subretiniano, para 93,3 e 93,9 %, respectivamente.

A DMRE atrófica apresenta um padrão típico, consistindo em hiperefletividade da coroide, resultado de uma diminuição da capacidade do tecido em atenuar a luz devido a um afinamento significativo do tecido retiniano subjacente (**Figura 12**).

Figura 12. Fundo de olho e OCT correspondente em caso de DMRI atrófica. (A) Imagem da biomicroscopia de um olho com DMRI atrófica em estado inicial. (B) OCT da retina do olho observado em (A). Observa-se um aumento da reflexividade na área foveal devido a atrofia (seta vermelha). (C) Biomicroscopia de um olho com atrofia importante. (D) OCT da retina do olho observado em (C). Observa-se uma extensa área de hiperrefletividade da faixa do epitélio pigmentado, apresentando a atrofia já avançada (área marcada em verde) (Garcia-Layana *et al.*, 2017).

1.2.2.3. Acuidade visual

A acuidade visual também pode auxiliar no diagnóstico da DMRI uma vez que ela sempre leva a uma baixa na visão central. Inicialmente leve, pode progredir, as vezes de forma brusca, levando a uma baixa de acuidade visual importante nos casos mais graves. Contudo, na maioria dos casos, a visão periférica é mantida mesmo chegando ao estágio de cegueira legal – que no Brasil é considerado quando a acuidade visual é igual ou menor que 0.05 (20/400) no melhor olho, com a melhor correção óptica – e, portanto, não se tornam totalmente dependentes em seu dia-a-dia (Soubrane, 2009).

Nos quadros iniciais da DMRI, a perda na acuidade visual quase não é percebida, porém, com a evolução da doença, a acuidade visual para perto sofrerá uma queda mais importante que a acuidade para longe, que só apresentará uma maior perda nos estágios mais avançados da doença.

Pacientes no estágio inicial da doença comumente queixam-se de metamorfofia, que consiste em um distúrbio causado pela distorção de parte da visão. A metamorfofia pode ser acompanhada tanto pelo clínico quanto pelos próprios pacientes através da grade de Amsler (**Figura 13A**). A grade de Amsler é uma grade quadrada, medindo 10 cm × 10 cm, usada para detectar ou monitorar a metamorfofia ou escotoma (**Figura 13B**) envolvendo o campo visual central em vários distúrbios da mácula e da cabeça do nervo óptico. Quando usada a 33 cm do olho, a grade pode verificar se há mudanças em um campo de 20 °, abrangendo 10 ° de cada lado (acima, abaixo e do lado esquerdo e direito) da fixação (Tripathy & Joe, 2019).

A aplicação da grade de Amsler deve ser realizada monocularmente, sem a indução da cicloplegia. A grade deverá ser mantida a 33 cm do olho, em um ambiente bem iluminado, com o uso da correção para perto quando necessário. O paciente então é instruído a responder as seguintes questões (Isaac *et al.*, 2007):

1. Você vê o ponto preto no centro da grade?
2. Mantendo seus olhos fixos no ponto preto ao centro da grade, você consegue ver os quatro cantos da grade?
3. Mantendo seus olhos fixos no ponto preto ao centro da grade, você consegue ver os quadrados menores? Eles estão intactos?
4. Mantendo seus olhos fixos no ponto preto ao centro da grade, você consegue ver alguma mancha preta ou buracos, áreas borradas ou linhas distorcidas?
5. Caso tenha respondido positivamente à pergunta 4 e, mantendo seus olhos fixos no ponto preto ao centro da grade, você é capaz de indicar a localização exata das alterações observadas?

Baseado nas respostas apresentadas, é possível ao clínico, identificar ou monitorar evoluções nos quadros de DMRI. A grade de Amsler deve ser verificada pelo menos uma vez por semana.

Embora seja um teste simples a grade de Amsler pode ser aplicada na detecção e acompanhamento de diversas doenças como, por exemplo, a coriorretinopatia serosa central, que provoca um escotoma central que pode ser redondo ou oval, dependendo da forma do descolamento neurossensorial da retina; a neurorretinopatia macular aguda, que produz um escotoma semelhante a uma pétala de flor; neuropatia óptica isquêmica anterior não-arterítica, na qual a grade pode revelar um defeito altitudinal no campo visual; o edema macular cistóide, doença na qual a distância entre os fotorreceptores aumenta devido ao edema macular, resultando em micropsia; tumor pituitário, onde a grade de Amsler pode ser usada para demonstrar hemianopsia bitemporal; e também retinopatia por hidroxicloroquina, que pode causar escotoma central; no entanto, a grade de Amsler atualmente não é recomendada como uma ferramenta de triagem para a retinopatia por hidroxicloroquina (Tripathy & Joe, 2019).

Dessa forma, se usada corretamente, a grade de Amsler pode ser uma ferramenta útil para clínicos e pacientes na detecção de áreas sutis de distorção, que podem se manifestar como resultado da DMRI (Jager *et al.*, 2008).

Figura 13. Grade de Amsler. Usada como teste rápido para verificar alterações envolvendo o campo visual central em vários distúrbios da mácula e da cabeça do nervo óptico, podendo contribuir para o diagnóstico da DMRI. **A.** Grade para teste e visão normal. **B.** As alterações observadas podem ser metamorfopsia (seta vermelha) e/ou escotoma (seta azul), sugerindo alteração retiniana e/ou agravamento do quadro da DMRI (Adaptado de Jager *et al.*, 2008).

Na DMRI atrófica, a perda de visão é lenta e progressiva, sendo pouco percebida em sua fase inicial. Porém, ao progredir, a dificuldade visual fica evidente, principalmente na visão de perto, com o aparecimento de pequenos escotomas perifoveais. Esta dificuldade visual estará intimamente ligada a localização e tamanho das placas de atrofia, uma vez que a preservação foveal pode se manter até os estágios mais avançados.

Em estágios muito avançados da DMRI atrófica, quando do aparecimento de atrofias extensas e de uma acuidade visual profundamente reduzida, será detectado um escotoma absoluto. É neste estágio que a curva de adaptação fotópica se altera e uma discromatopsia do eixo azul-amarelo se torna evidente (Soubrane, 2009). Posteriormente, a atrofia se estenderá à área foveal e o escotoma também se torna central e cada vez mais denso.

Na DMRI exsudativa, o fator da neovascularização é determinante e irá diferir a velocidade da progressão da baixa na acuidade visual. Assim, quando se trata de uma neovascularização oculta (subepitelial), a baixa na acuidade visual e o aparecimento das metamorfopsias terão uma evolução lenta e progressiva, sendo difícil de distingui-la das alterações normais da idade (Ferris *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014). Por outro lado, neovasos coroides visíveis levam a uma síndrome funcional importante, com rápida baixa de acuidade visual associada a metamorfopsias evidentes. O aparecimento e agravamento destes sinais são paralelos à extensão dos neovasos e sua localização em relação ao centro da fóvea. O aparecimento de neovasos a mais de 200 µm da fóvea, levou a uma perda de acuidade visual de 6 linhas em 60 % dos casos não tratados nos primeiros 18 meses (Friedman *et al.*, 2016). Esta perda de visão está relacionada a morte dos fotorreceptores, secundária a dispersão dos elementos celulares, decorrente da neovascularização e da fibrose secundária (Seddon, 2003; van Lookeren Campagne *et al.*, 2014).

1.2.3. Fatores de risco

A DMRI é uma doença multifatorial, dessa forma, muitos fatores estão ligados ao seu desenvolvimento e progressão. A complexidade da doença se traduz na diversidade de fatores de risco identificados. Aproximadamente 70 fatores de risco já foram identificados e, entre os principais fatores de risco, podemos citar a idade, etnia, fumo, dieta, exposição solar e a predisposição genética (Chakravarthy *et al.*, 2010).

A idade é o principal fator de risco e está diretamente relacionada com o aumento na prevalência da DMRI, tendo sua incidência aumentada após os 50 anos (Eye Diseases Prevalence Research Group, 2004; Santos *et al.*, 2005; Chakravarthy *et al.*, 2010; Lim *et al.*, 2012; Mehta, 2015; Lambert *et al.*, 2016).

A etnia também é um fator importante para o desenvolvimento da DMRI, uma vez que foi observado uma maior prevalência em pacientes de etnia branca não-hispânica, seguido pelos chineses, hispânicos e negros (Soubrane, 2009; Mehta, 2015; Lambert *et al.*, 2016). A etnia também parece influenciar no desenvolvimento da DMRI, uma vez que foi encontrado maior taxa de DMRI neovascular em brancos quando comparados a negros. Porém, estágios avançados da DMRI seca, incluindo a atrofia geográfica, foi mais associado com negros que a brancos (Lambert *et al.*, 2016).

Um fator interessante que está relacionado a uma maior incidência da DMRI é a cor da íris. Pacientes com íris mais claras apresentaram uma incidência de DMRI duas vezes maior quando comparados com pacientes de íris escuras (Nicolas *et al.*, 2003). A cor da íris também está relacionada a diferentes estágios da doença, pacientes com íris escura são mais propensos a desenvolver o estágio inicial da DMRI, porém, apresentam uma menor probabilidade de desenvolver despigmentação do epitélio pigmentado da retina, uma característica do estágio avançado da DMRI (Tomany *et al.*, 2003; Nicolas *et al.*, 2003; Lambert *et al.*, 2016).

O fumo também está relacionado a uma maior incidência de DMRI. Pacientes fumantes apresentaram duas vezes mais chances de desenvolver DMRI que não fumantes. Outro dado relacionado ao fumo é que a incidência de DMRI exsudativa é três vezes maior em pacientes fumantes comparado a pacientes não fumantes (Santos *et al.*, 2005; Chakravarthy *et al.*, 2010; Lim *et al.*, 2012; Cheung & Eaton, 2013; Ratnapriya & Chew, 2013; Mehta, 2015).

Dietas ricas em antioxidantes como β -caroteno, vitamina C, vitamina E, zinco, luteína, zeaxantina e ácidos graxos ômega-3 foram associadas a uma redução do risco de perda da visão em 19 %, menor incidência e diminuição do progresso da DMRI para seu quadro exsudativo em 25 %. Estes dados reforçam a hipótese que o estresse oxidativo também esteja envolvido no processo de desenvolvimento da DMRI (AREDS, 2000; Bowes Rickman *et al.*, 2013; Mehta, 2015; Lambert *et al.*, 2016).

O fator genético também é de grande importância para o desenvolvimento da DMRI. Foram identificados 5 genes principais para o aparecimento precoce da DMRI seca, são eles AboE, ABCA4, CFH, CFBE, LOC387715 (Soubrane, 2009). De acordo com Soubrane (2009), estes genes seriam responsáveis por algo entre 50 e 74 % dos casos diagnosticados. Contudo, diversos outros genes foram relacionados ao desenvolvimento da DMRI, como CFH (*complement factor H*; chr 1), ABCA4 (*ATP-binding cassette transporter*; chr 1), COL8A1 (*collagen type 8 alpha 1 subunit*; chr 3), CF1 (*complement factor 1*; chr 4), VEGFA (*vascular endothelial growth factor A*; chr 6), FRK/COL10A1 (*fyn-related kinase/alpha chain of type X collagen*; chr 6), CFB (*complement factor B [properdin]*; chr 6), C2 (*complement component 2*; chr 6), ARMS2/HTRA1 (*HtrA-serinepeptidase1*; chr 10), LIPC (*hepatic lipase*; chr 15), CETP (*cholesterylester transfer protein*; chr 16), APOE (*apolipoprotein E*; chr 19), C3 (*complement component 3*; chr 19), TIMP3 (*tissue inhibitor of metalloproteinase 3*; chr 22), TNFRSF10A (*tumour necrosis factor receptor superfamily 10a*; chr 8) (Lim *et al.*, 2012), ARMD1, EFEMP1, STGD4, RDS, CORD7, STGD3, MCDR1, RCS1, VMD, VMD2, STGD2, CORD5, CACD, CORD4, CORD1, CRX (Evans, 2001), BF (Rattner & Nathans, 2006). Embora exista diversos genes relacionados a DMRI, o papel genético para o desenvolvimento e progressão da doença continua a ser estudado e não se sabe exatamente qual é o poder de sua participação no aparecimento ou desenvolvimento da DMRI.

A obesidade também está relacionada ao desenvolvimento da DMRI inicial, bem como à progressão aos estágios mais avançados (Lambert *et al.*, 2016). Um estudo mostrou um aumento em duas vezes na progressão da DMRI em pacientes com maior circunferência abdominal. Além disso, pacientes que praticam exercícios com alta intensidade, três vezes por semana, tiveram uma redução em 25 % no risco da progressão da DMRI quando comparado com pacientes que não se exercitam (Seddon, 2003). Em estudo realizado por Adams *et al.* (2011) observou-se que o aumento na razão cintura-quadril de 0,1 está correlacionado a um aumento de 13 % na chance de desenvolvimento da DMRI inicial e em 75 % da fase avançada da doença. Assim, ainda que existam trabalhos relacionando a obesidade à DMRI, os resultados são controversos quanto a relação causal entre os dois.

A hipertensão arterial também está associada a DMRI. Em comparação a sujeitos normotensos, tanto pacientes hipertensos tratados quanto pacientes sem controle da pressão arterial apresentaram chances três vezes maiores de desenvolver a forma exsudativa da DMRI

(Klein *et al.*, 2003). Outro estudo concluiu que até mesmo pacientes com pressão arterial controlada tinham um risco aumentado de desenvolver DMRI exsudativa (Hyman, 2000). A hipertensão também está correlacionada com o tamanho das drusas. Os estudos realizados pelo grupo AREDS mostraram que a presença de drusas grandes na região da mácula ou drusas extensas de tamanho intermediário está associada a hipertensão (AREDS, 2000). Por outro lado, outra pesquisa não encontrou relação entre doenças cardiovasculares, incluindo hipertensão, e o risco de DMRI exsudativa (Delcourt *et al.*, 2001).

Outros fatores também podem influenciar o aparecimento ou desenvolvimento da DMRI. A cirurgia de catarata também está associada ao aumento da incidência do desenvolvimento da DMRI neovascular (Chakravarthy *et al.*, 2010). Outro estudo apresentou uma maior incidência de DMRI em mulheres com menopausa precoce após ovariectomia, o que poderia ser explicado por uma perda do efeito protetor dos estrogênios após a menopausa (Evans, 2001).

Ainda que exista vários fatores de risco, há um consenso na literatura que os principais fatores de risco para o desenvolvimento da DMRI são idade, histórico familiar e o tabagismo (Nicolas *et al.*, 2003; Tuo *et al.*, 2004; Rattner & Nathans, 2006; Ding *et al.*, 2009; Chakravarthy *et al.*, 2010).

1.2.4. Fisiopatologia

A patologia da DMRI é caracterizada pela degeneração envolvendo os fotorreceptores retinianos, a camada pigmentada da retina e a membrana de Bruch, bem como, em alguns casos, alterações nos capilares coroidais (Coleman *et al.*, 2008; Ding *et al.*, 2009). O processo patológico da DMRI envolve alterações do envelhecimento juntamente com alterações patológicas. Tanto no envelhecimento quanto na DMRI, ocorre lesão no epitélio pigmentado devido ao estresse oxidativo e resposta inflamatória na membrana de Bruch causada por esta lesão. Acontece também a produção de matriz extracelular anormal pelo epitélio pigmentado e corioide lesionados. Por fim, ocorre a perturbação da homeostase do complexo epitélio pigmentado-membrana de Bruch, levando à atrofia do epitélio pigmentado e coriocapilares ou crescimento da membrana neovascular da corioide (Lim, 2007).

Estudos ressaltam alterações no epitélio pigmentado e no complexo membrana de Bruch-coroide causadas pela idade (Feeney-Burns & Ellersieck, 1985; Del Priore *et al.*, 2002). Estas estruturas são importantes para a manutenção dos fotorreceptores retinianos. Os capilares coroidianos são importantes para a nutrição dos fotorreceptores, uma vez que liberam as moléculas do sangue que, após atravessarem a membrana de Bruch, são conduzidas aos fotorreceptores pelas células do epitélio pigmentado, que formam a barreira hematorretiniana (Campbell & Humphries, 2012; Cholkar *et al.*, 2013).

O epitélio pigmentado apresenta funções vitais para assegurar o bom funcionamento das células fotossensíveis. Nesta camada está presente a melanina, substância que absorve a luz que atinge a camada externa da retina e seria refletida de volta às células fotossensíveis, auxiliando, dessa forma, no aumento do contraste da imagem e protegendo os fotorreceptores de uma possível fototoxicidade. Esta estrutura também é responsável pela síntese e armazenamento da vitamina A, que é substrato para a formação do fotopigmento contido na rodopsina (Siegel & Sapru, 2006), pela fagocitose dos resíduos do metabolismo dos fotorreceptores e pela reciclagem dos segmentos dos fotorreceptores (Bhutto & Lutty, 2012). Além de remover os resíduos do fotorreceptores, reciclando-os ou degradando-os completamente, o epitélio pigmentado pode exocitar restos metabólicos para o complexo coriocapilar para sua eliminação da retina (Bhutto & Lutty, 2012).

Outra função importante desempenhada pelo epitélio pigmentado, é a produção e secreção de fatores de crescimento, como fatores de crescimento de fibroblastos (FGF-1, FGF-2 e FGF-5) (Wada *et al.*, 2001), fator de transformação do crescimento β (TGF- β) (Khaliq *et al.*, 1995), fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) (Slomiany & Rosenzweig, 2004), fator neurotrófico ciliar (CNTF) (Walsh *et al.*, 2001), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (Campochiaro *et al.*, 1989, 1994), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Adamis *et al.*, 1994), fator de crescimento celular derivado do cristalino (LEDGF) (Ahuja *et al.*, 2001), membros da família das interleucinas e fator derivado do epitélio pigmentado (PEDF) (Wenkel & Streilein, 2000; Streilein *et al.*, 2002) para ajudar a construir e sustentar a coroide e os fotorreceptores.

O processo de envelhecimento celular do epitélio pigmentado também leva ao acúmulo de lipofucsina, à diminuição da atividade lisossomal e à redução da capacidade de fagocitose dos segmentos externos dos fotorreceptores, o que induz a uma série de disfunções celulares,

levando a alterações na matriz intra e extra-celular e, conseqüentemente a uma alteração funcional da retina.

Estudos histopatológicos também ressaltam alterações causadas pela idade no complexo membrana de Bruch-coroide. A membrana de Bruch é uma camada tissular com espessura entre 2 a 4 milímetros formada pela parte mais interna da coroide e pela parte mais externa do epitélio pigmentado. A função da membrana de Bruch é servir como uma barreira hematorretiniana, servindo de filtro molecular para regular parcialmente a troca de nutrientes, fluidos, oxigênio e resíduos metabólicos entre a retina externa e o suprimento de sangue da coroide (Xiang *et al.*, 2014). O envelhecimento da membrana de Bruch reduz sua permeabilidade, resultando em uma redução na reabsorção dos resíduos do metabolismo do epitélio pigmentado, bem como na redução da nutrição dos fotorreceptores.

Estas estruturas são de suma importância para a manutenção dos fotorreceptores e, dessa forma, alterações na estrutura ou no funcionamento delas podem resultar em alterações negativas para o sistema visual como um todo.

Pesquisas sobre a patologia molecular da DMRI sugerem papéis importantes para o estresse oxidativo (Beatty *et al.*, 2000; Jarrett & Boulton, 2012; Bellezza, 2018), inflamação (Zarbin, 2004; Buschini *et al.*, 2011; Ardeljan & Chan, 2013; Cheung & Eaton, 2013; Kauppinen *et al.*, 2016), metabolismo lipídico (Abdelsalam *et al.*, 1999), angiogênese (Bhutto & Luty, 2012; Bowes Rickman *et al.*, 2013; Kent, 2014; Horie-Inoue & Inoue, 2014) e sistema imune (Johnson *et al.*, 2000; Buschini *et al.*, 2011; Ambati & Fowler, 2012; Ambati *et al.*, 2013; Cheung & Eaton, 2013).

A retina em geral, e a mácula, em particular, são altamente suscetíveis ao estresse oxidativo, dada sua elevada demanda de oxigênio, alta atividade metabólica, exposição à fotorradiação, presença de fotossensibilizadores e processos de oxidação da fagocitose dos fotorreceptores (Ding *et al.*, 2009). Descobertas *in vitro* e *in vivo* em animais indicam que o depósito laminar basal pode se formar como resultado da peroxidação lipídica induzida por radicais livres de membranas celulares do epitélio pigmentado (Zarbin, 2004).

Muitas pesquisas da etiologia da DMRI têm como foco o papel do estresse oxidativo, em especial as substâncias antioxidantes (Beatty *et al.*, 2000; Zarbin, 2004; Jarrett & Boulton, 2012; Bowes Rickman *et al.*, 2013; Askou *et al.*, 2017; Bellezza, 2018). As enzimas

antioxidantes como, por exemplo, a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPX), constituem a principal defesa contra o dano oxidativo do epitélio pigmentado (Zarbin, 2004). Contudo, estudos mostraram que com a idade os níveis plasmáticos de antioxidantes como a glutathione (GSH), o ácido ascórbico (vitamina C), o tocoferol (vitamina E), a catalase (CAT), bem como o pigmento macular, estão reduzidos (Beatty *et al.*, 2000).

O pigmento macular é composto pelos carotenoides, luteína e zeaxantina (Zarbin, 2004; Lima *et al.*, 2016). Eles funcionam como um filtro que protege a mácula da luz azul, como antioxidante e também como removedor de radicais livres para reduzir o dano induzido pelo estresse oxidativo (Beatty *et al.*, 2000; Lima *et al.*, 2016). Por outro lado, os níveis de glutathione oxidada (GSSG), a peroxidação lipídica (Jarrett & Boulton, 2012) e a lipofuscina (Beatty *et al.*, 2000), que são sinais de uma maior atividade oxidante, estão aumentados (Zarbin, 2004).

Outro fator que apoia a teoria da participação do estresse oxidativo na etiologia da DMRI é que a suplementação de antioxidantes (ácido ascórbico, 500 mg.d⁻¹; tocoferol, 400 IU.d⁻¹; e β-caroteno, 15 mg.d⁻¹) e minerais (óxido de zinco, 80 mg.d⁻¹; óxido cúprico, 2 mg.d⁻¹) através da alimentação reduziu o risco de desenvolver a fase avançada da DMRI de 28 para 20 % e a perda significativa da visão foi reduzida de 29 para 23 % (AREDS, 2001; Zarbin, 2004).

O papel do estresse oxidativo é ainda reforçado por estudos epidemiológicos que demonstram aumento do risco com o tabagismo, considerado um forte estressor oxidativo (Smith *et al.*, 2001; Bowes Rickman *et al.*, 2013; Mitchell *et al.*, 2018).

Processos oxidativos elevados, autofagia acentuada e aumento da exo e transcitose em células do epitélio pigmentado têm sido associados à formação de drusas. Além disso, há evidências sugerindo que a inflamação crônica de baixo nível e a ativação do Complemento desempenham papéis importantes na formação das drusas. O material de drusas isolado também provou ser pró-inflamatório através da ativação de sistemas de sinalização como o NF-κB e as vias do inflamassoma (Ambati *et al.*, 2013; Kauppinen *et al.*, 2016).

Biomarcadores de inflamação foram analisados no sangue periférico, soro ou plasma e foi encontrado um aumento dos níveis de componentes do Complemento no sangue de pacientes com DMRI (Kauppinen *et al.*, 2016). A participação da inflamação na etiologia da DMRI também é apoiada por estudos que revelaram que a administração de corticosteroides

intravítreos reduzem a incidência de neovascularizações induzidas por *laser* em primatas, possivelmente alterando a atividade e/ou números de células inflamatórias na coroide. Outros mecanismos potenciais incluem a redução da expressão do VEGF e regulação negativa da molécula de adesão intercelular 1, que é constitutivamente expressa em células endoteliais do epitélio pigmentado e da coroide e medeia a adesão e diapedese de leucócitos durante a inflamação (Kauppinen *et al.*, 2016).

O processo patológico da DMRI envolve alterações oxidativas e inflamatórias do envelhecimento juntamente com alterações patológicas. Algumas dessas alterações foram sintetizadas no esquema da **Figura 14**.

Figura 14. Relação entre os fatores do envelhecimento e DMRI. Relação entre os mecanismos naturais, presentes no envelhecimento e os processos patológicos envolvidos no desenvolvimento da DMRI (Adaptado de Zarbin, 2004).

Vários receptores de reconhecimento de padrões são ativados por sinais intra e extracelulares, induzindo uma resposta inflamatória além da para-inflamação que sustenta a homeostase. Alterações degenerativas nas células do epitélio pigmentado desencadeiam um ciclo vicioso que promove o desenvolvimento de inflamação crônica na retina e na coroide. Alterações relacionadas com a idade no sistema imunológico contribuem para este processo destrutivo, alterando as funções das células imunes (Kauppinen *et al.*, 2016).

Microglia são células do sistema nervoso central e retina e constituem sua principal defesa imune. Essas células são ativadas por lesão e degeneração na retina e, quando ativas, proliferam

e migram para o local da lesão para degradar e remover os detritos celulares e secretar citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (Buschini *et al.*, 2011). A ativação da microglia por um longo período resulta em uma neuroinflamação crônica. Porém, estudos encontraram acúmulo de microglia apenas no estágio avançado da DMRI seca e na atrofia geográfica, sugerindo sua participação no aparecimento e avanço desses estágios (Ardeljan & Chan, 2013; Bowes Rickman *et al.*, 2013).

Em 2003 Ambati descreveu um modelo animal com camundongos deficientes tanto na proteína 1-quimioatraente de monócitos (Ccl-2; também conhecida como MCP-1) quanto no receptor-2 de quimiocina (Ccr-2) que desenvolvem características da DMRI, incluindo acúmulo de lipofuscina e drusas, atrofia dos fotorreceptores e neovascularização (Ambati *et al.*, 2003). A produção de Ccl-2 induzida pelo fator C5a do sistema complemento e pela imunoglobulina G (IgG) pode mediar a infiltração de macrófagos na coroide, porém os macrófagos degradam o fator C5a e o IgG. Assim, um recrutamento macrofágico debilitado pode levar ao acúmulo de C5a e IgG, induzindo a produção de fator de crescimento endotelial vascular pelo epitélio pigmentado, possivelmente mediando o desenvolvimento neovascular (Ambati *et al.*, 2003). Neste mesmo modelo animal, a morte das células do epitélio pigmentado foi associada com locais de agregação microglial (Chen *et al.*, 2011; Ardeljan & Chan, 2013).

Os macrófagos parecem desempenhar papel importante na patologia da DMRI uma vez que são encontrados nas regiões de atrofia do epitélio pigmentado, do rompimento da membrana de Bruch e na neovascularização (Coleman *et al.*, 2008). Macrófagos são células imunes inatas de natureza dicotômica, são capazes de desencadear respostas relacionadas à pró e anti-inflamação, ativação e supressão imunológica e manutenção e destruição tecidual (Ardeljan & Chan, 2013). Estudos em tecido post-mortem associaram o acúmulo de macrófagos com ativação do sistema Complemento (Wang *et al.*, 2015; van Lookeren Campagne *et al.*, 2016).

Dessa forma, a hipótese atual é de que haja um comprometimento inicial do metabolismo do epitélio pigmentado através do estresse oxidativo, desencadeando um ciclo de eventos imuno-inflamatórios, levando a processos degenerativos e culminando com a morte das células do epitélio pigmentado e dos fotorreceptores, causando a forma *atrófica* da DMRI. Outro grupo de pacientes podem reagir às alterações com uma resposta neovascular, causando a forma *exsudativa* da DMRI.

Atualmente, sabe-se que a patogênese da DMRI envolve uma interação complexa entre fatores genéticos, ambientais, metabólicos e funcionais, porém, apesar dos recentes avanços, sua etiologia ainda não está totalmente compreendida (Cheung & Eaton, 2013).

1.3. Avaliação funcional dos fotorreceptores

Muitas doenças oftálmicas como a DMRI, a retinite pigmentosa, o glaucoma e a retinopatia diabética, podem produzir danos na retina e levar à perda severa da visão, incluindo cegueira legal. É bem conhecido que diferentes doenças têm como alvo diferentes tipos celulares na retina como, por exemplo, os bastonetes são mais vulneráveis que os cones na DMRI inicial (Curcio *et al.*, 1996; Owsley *et al.*, 2007), enquanto no glaucoma, existe uma perda maior de células ganglionares (Kendell *et al.*, 1995; Klein *et al.*, 1995; Medeiros *et al.*, 2012). As alterações fisiológicas nas células afetadas podem ocorrer antes mesmo da morte neuronal. Assim, a avaliação funcional da integridade fisiológica das células é importante para a detecção precoce da doença e para o direcionamento da conduta médica (Zhang *et al.*, 2015).

Os cones estão concentrados na fóvea, parte central da mácula, que é região mais atingida pela DMRI. À medida que os cones morrem, a percepção das cores é alterada, deixando as cores mais desbotadas ou menos brilhantes. Portanto, avaliar a visão de cores é avaliar a função dos cones e a integridade foveal.

O teste de visão de cores *Cambridge Colour Test* (CCT), é um teste psicofísico computadorizado, desenvolvido em 1989 por Mollon e Regan, com o objetivo de avaliar a visão de cores. Este teste foi desenvolvido baseado nos testes clássicos de pranchas pseudoisocromáticas e combina os princípios de Chibret e Stilling (Mollon & Reffin, 1989). O Princípio de Chibret (1877) afirma a possibilidade de variar a diferença cromática do alvo e do campo de forma dinâmica e adaptativa, ao longo de diferentes direções no espaço de cores, e, por sua vez, Stilling alcançou o ruído não-matiz, variando o tamanho e luminância dos elementos de destino e de fundo (Regan *et al.*, 1994).

Dessa forma, o teste CCT consiste na apresentação de um alvo colorido na forma do optótipo “C” de Landolt em um fundo formado por círculos de tamanhos diferentes e com luminância variável, servindo de ruído e impedindo assim que o brilho e o contorno sejam usados como dicas para a discriminação da tarefa (**Figura 15**). A posição do estímulo muda a

cada nova apresentação (abertura para cima, para baixo, esquerda ou direita) e a tarefa do sujeito é identificar a orientação do “C” de Landolt em um método psicofísico de escolha forçada.

Figura 15. Exemplo do estímulo usado para avaliação da discriminação cromática no teste *Cambridge Colour Test (CCT)*. O teste CCT consiste na apresentação de um alvo colorido em um fundo ruidoso, sendo a tarefa do sujeito é identificar a orientação do “C” de Landolt em um método psicofísico de escolha forçada (Adaptado de Ventura *et al.*, 2007).

No início do teste, as cores do estímulo são muito distantes da cor do fundo no diagrama de cromaticidade CIE 1976. A cada resposta correta, a cromaticidade do estímulo aproxima-se da cromaticidade do fundo e a cada resposta errada, ela se distancia, até que seja determinado o limiar, através do método de escada. Ao final do teste são gerados valores para o limiar de detecção dos eixos analisados, em termos de coordenadas $u'v'$ do espaço CIE 1976, cuja análise quantitativa permite a identificação de graus sensíveis de discromatopsia. Assim, através de protocolos pré-programados no CCT, é possível avaliar a atividade dos três tipos de cones e, detectar com sensibilidade alterações fisiológicas.

Outra técnica psicofísica utilizada para avaliar a atividade dos fotorreceptores, a nível pós-receptoral, é a técnica da fotometria de *flicker* heterocromático (HFP, do inglês, *heterochromatic flicker photometry*). Esta técnica consiste na comparação da luminância de duas fontes de cores diferentes. A intensidade de uma dessas fontes é ajustada até que a percepção de *flicker* seja eliminada ou minimizada. Assim, a cor observada é a mistura aditiva das cores das duas fontes. Apesar da mistura das cores, o *flicker* é observado desde que as luminâncias não sejam correspondentes. A eliminação ou minimização desse *flicker* é um meio

relativamente simples de combinar com precisão o brilho de duas fontes de comprimento de onda diferentes.

A frequência do *flicker* é crítica na obtenção de resultados confiáveis. Em baixas frequências, o *flicker* não pode ser eliminado, e em altas frequências o *flicker* não pode não ser observado em algumas intensidades das duas fontes. O sujeito será capaz de obter um nulo agudo correspondendo a luminância iguais das duas fontes somente quando a frequência for ajustada para um valor crítico (Bone & Landrum, 2004).

Assim, este método oferece uma forma de medir a função de eficiência luminosa fotópica, uma função que descreve a capacidade relativa de diferentes comprimentos de onda para provocar uma sensação constante de luminância.

O HFP se tornou o principal método psicofísico para a medir da densidade óptica do pigmento macular (Lima *et al.*, 2016). Estímulos são compostos por um comprimento de onda de teste que é absorvido pelo pigmento macular (tipicamente - azul, 460 nm) e um comprimento de onda de referência que não é absorvido (tipicamente - verde, 540 nm), que são aplicados sobre o centro da fóvea, depois sobre a zona parafoveal, onde o pigmento é opticamente indetectável. O paciente ajusta então a intensidade da luz azul até suprimir o efeito *flicker*, que deve ser aumentado para compensar a absorção pelo pigmento macular (Bone & Landrum, 2004).

Este método apresenta uma série de vantagens em relação a outras metodologias como, por exemplo, não requer dilatação pupilar, é relativamente insensível a mudanças nos meios oculares, e o alinhamento do sujeito não é crítico. Contudo, o HFP não é adequado a todos os sujeitos devido aos requisitos para participação. Pessoas com deficiência visual severa e aqueles que estão física ou mentalmente doentes para responder ao teste (Snodderly *et al.*, 2004).

Outra forma de estudar a atividade dos cones, em contraste com os métodos psicofísicos de avaliação de visão de cores que dependem da percepção subjetiva de cor do paciente, é a eletroretinografia (ERG), técnica não invasiva que permite o avaliar os circuitos celulares envolvidos no processamento visual, dos fotorreceptores a vias pós receptoras retinogênicas (Kremers *et al.*, 2010).

Uma das técnicas de ERG é o *flicker* heterocromático que consiste na modulação de LEDs vermelhos e verdes em contrafase nas frequências temporais de 36 Hz, que avalia a via

magnocelular (luminância) (Chang *et al.*, 1993; Kremers *et al.*, 2010), e 12 Hz, que reflete a atividade da via parvocelular (oponência cromática) (Jacob *et al.*, 2015). Esta diferença de resposta obtida pela modulação da frequência temporal no ERG deve-se a presença de três tipos de células ganglionares diferentes que desempenham papéis importantes em toda a via óptica e são as fontes das diferentes vias de processamento paralelo.

As células ganglionares do tipo midget compreendem mais de 70 % das projeções para o corpo geniculado lateral (CGL) e dão origem à via parvocelular. Essas células codificam com alta resolução espacial e baixa resolução temporal por causa de seus pequenos campos receptivos e de sua baixa velocidade de condução axonal. Elas analisam os inputs dos canais verde e vermelho e são um componente importante na visão de cores. Porém, como elas operam em baixa resolução temporal, as células ganglionares do tipo midget estão envolvidas no processamento de imagens estáticas, mas não participam do processamento de movimento (Ribeiro & Castelo-Branco, 2010; Lee, 2011).

Já as células ganglionares do tipo parasol constituem cerca de 10 % de todas as projeções para o CGL e são a origem da via magnocelular. Elas codificam com baixa resolução espacial e alta resolução temporal por causa de seus grandes campos receptivos e de sua alta velocidade de condução axonal. Além disso, codificam em um sinal acromático, participando então da detecção de contraste, movimento e forma (Ribeiro & Castelo-Branco, 2010; Lee, 2011).

A via coniocelular tem origem nas células ganglionares biestratificadas, que compreendem 8 % das projeções para a própria camada no CGL, mas estão espalhadas por todas as camadas das vias parvocelulares e magnocelulares. Essas células analisam os sinais das cores azul e amarelo (Krebs *et al.*, 2013). A **Figura 16** apresenta um resumo didático dessas vias, suas projeções e participação no processo visual.

Figura 16. Resumo das vias magno, parvo e coniocelular. A via magnocelular tem origem nas células ganglionares do tipo parvasol e processam baixa resolução espacial, alta resolução temporal, contraste e movimento. A via parvocelular é responsável pelo processamento de alta resolução espacial, baixa resolução temporal, acuidade e parte das informações cromáticas, auxiliada pela via coniocelular que também participa do processamento cromático. Do corpo geniculado lateral (CGL) as informações são enviadas ao córtex visual primário e, posteriormente, dividida em duas vias dorsal e ventral que processam e se projetam a outras áreas do córtex visual (Krebs *et al.*, 2013).

Dessa forma, a modulação de contraste cromático nos permite criar um estímulo capaz de ter características cromáticas e de luminância dependendo de modulações nas frequências temporais que permitem que o sinal pós-receptor nos forneça informações sobre a integridade das vias parvocelular (na qual é processada a oposição ou diferença entre os sinais provenientes dos cones L e M) e magnocelular (na qual é processada a soma dos sinais provenientes dos cones L e M) (Jacob *et al.*, 2015).

Outra técnica utilizada para avaliar a atividade dos fotorreceptores é a pupilometria cromática, com a medida do reflexo pupilar à luz a estímulos destinados a ativar diferentes tipos celulares. O reflexo pupilar à luz descreve a atividade de contração e a subsequente dilatação da pupila em resposta à luz e tem como função limitar a quantidade de luz que entra pela pupila e incide sobre a retina. Em condições de grande luminosidade, as pupilas se contraem para proteger a retina e para focalizar a luz incidente sobre a retina a fim de obter uma melhor projeção da imagem.

A via aferente do reflexo pupilar começa com a participação dos fotorreceptores. A resposta dos receptores é enviada às células ganglionares e então é transmitida através do nervo óptico e trato óptico até o núcleo pré-tectal do mesencéfalo. O núcleo de Edinger-Westphal (núcleos viscerais do nervo oculomotor) é o responsável por ativar a via eferente do reflexo através dos sinais enviados pelas fibras pré-ganglionares parassimpáticas que saem dos núcleos viscerais do nervo oculomotor, junto com o nervo oculomotor, para as órbitas, fazendo sinapse com o gânglio ciliar. Os neurônios pós-sinápticos formam os nervos ciliares curtos a partir do gânglio ciliar e inervam o músculo esfíncter da pupila. Este esfíncter é um músculo circular na íris que quando se contrai, faz a pupila contrair (**Figura 17**; Hall & Chilcott, 2018).

Figura 17. Vias envolvidas no reflexo pupilar. O reflexo pupilar começa na retina interna que envia os sinais até o núcleo pré-tectal através do nervo óptico. O núcleo de Edinger-Westphal (núcleo visceral do nervo oculomotor) é o responsável por ativar a via eferente do reflexo através dos neurônios pós-sinápticos que formam os nervos ciliares curtos a partir do gânglio ciliar e inervam o músculo esfíncter da pupila. Este esfíncter é o músculo da íris que quando se contrai, fazendo a pupila contrair (Adaptado de Krebs *et al.*, 2013).

O estímulo para a redilatação pupilar é iniciado pela via do hipotálamo posterior. As fibras se projetam então pelo tronco encefálico e para os neurônios pré-ganglionares simpáticos no corno intermediário da medula espinhal a nível T1. Neste ponto, as fibras fazem sinapse e passam pela cadeia simpática até o gânglio cervical superior. Ao deixarem o gânglio, as fibras pós-sinápticas dirigem-se com a artéria carótida até o crânio, onde se juntam ao nervo oftálmico que as levam para a órbita. As fibras entram no olho com os nervos ciliares longos que inervam o músculo dilatador da pupila, cuja constrição leva a dilatação pupilar (**Figura 18**; Hall & Chilcott, 2018).

Figura 18. Vias envolvidas na dilatação pupilar. O estímulo para a redilatação pupilar inicia no hipotálamo posterior que projeta fibras para os neurônios pré-ganglionares simpáticos no corno intermediário da medula espinhal a nível T1. Neste ponto, as fibras fazem sinapse até o gânglio cervical superior. Ao deixarem o gânglio, as fibras pós-sinápticas se juntam ao nervo oftálmico que as levam para a órbita entrando no olho juntamente com os nervos ciliares longos que inervam o músculo dilatador da pupila, cuja constrição leva a dilatação pupilar (Krebs *et al.*, 2013).

O reflexo pupilar à luz permite avaliar o sistema nervoso autônomo, assim como fornece dados sobre a viabilidade dos fotorreceptores (Hall & Chilcott, 2018). O sistema dos bastonetes tem uma maior resposta em comprimentos de onda mais curtos do que a via do cone, com essa diferença se aproximando de zero em comprimentos de onda maiores que 650 nm (Park & McAnany, 2015). Dessa forma, para favorecer a avaliação da atividade dos bastonetes, Aguilar e Stiles determinaram que um estímulo de teste de comprimento de onda menor que 490 nm fornecerá uma proporção maior de bastonetes para cones (Aguilar & Stiles, 1954; Rukmini *et al.*, 2019). Para estimular os cones, um estímulo de comprimento de onda maior que 610 nm, com adaptação à luz de fundo, favorece a proporção de cones ativados em relação a bastonetes. Abaixo da intensidade luminosa correspondente ao limiar de resposta do cone (~ 1 Troland¹), todos os comprimentos de onda do estímulo são mediados via bastonetes (Kelbsch *et al.*, 2019).

Estudos demonstraram que as ipRGCs participam do reflexo pupilar à luz em primatas. Gamlin e colaboradores descobriram que mesmo quando os sinais de cones e bastonetes são bloqueados farmacologicamente, o reflexo pupilar à luz persiste e que a sensibilidade espectral da resposta residual está intimamente relacionada a sensibilidade espectral da melanopsina, que tem absorção máxima por volta de 483 nm. Além disso, este estudo descobriu que, tanto em humanos como em macacos, a fotoresposta de melanopsina de ipRGCs é responsável pela constrição pupilar pós-iluminação, ou pela manutenção da constrição pupilar resultante de um estímulo de alta intensidade (Gamlin *et al.*, 2007; McDougal & Gamlin, 2010).

Com isso, Park e colaboradores desenvolveram um protocolo clínico para avaliação da participação de cada tipo de fotorreceptor na constrição pupilar. Primeiro, ele determinou que o tempo de estímulo de 1 segundo de duração apresenta melhores resultados que estímulos mais longos ou mais curtos. Também observou que estímulos com intensidade entre -3 e $-2 \log \text{cd.m}^{-2}$ apresentados ao olho adaptado ao escuro, acessam respostas em grande parte, se não totalmente, mediadas por bastonetes. A atividade das células ipRGCs pode ser observada como a resposta sustentada após um estímulo de comprimento de onda de, aproximadamente 467 nm, com intensidade igual a $2,6 \log \text{cd.m}^{-2}$. Para isolar as respostas mediadas por cones, usou-se um estímulo com comprimento de onda de, aproximadamente 640 nm, com intensidade igual a

¹ Troland (Td) é a unidade de medida da luz incidente que entra numa área elementar da Retina. É calculada através da fórmula: $Td = L \times p$, onde L é a luminância em cd.m^{-2} e p é a área da pupila em mm^2 . Assim, com uma candela (cd) por m^2 em uma pupila com 1 mm^2 , teremos 1 Troland.

2,6 log cd.m⁻², sobre um fundo azul de 0,78 log cd.m⁻². Este fundo não só suprime a contribuição dos bastonetes, como também parece suprimir a maior parte da contribuição da melanopsina para o estímulo de 1 segundo (Park *et al.*, 2011).

Os métodos psicofísicos, como o teste da grade de Amsler, a acuidade visual (Klein *et al.*, 1995), a perimetria da hiperacuidade (Loewenstein *et al.*, 2003) e a visão de cores (Vemala *et al.*, 2017), são práticos para aplicações clínicas, mas envolvem não só a resposta neuronal da retina como também áreas de processamento cortical superior. Portanto, os métodos psicofísicos não fornecem informações exclusivas sobre a resposta dos diferentes tipos celulares da retina. Por outro lado, os métodos eletrofisiológicos, como eletrorretinografia focal (ERG) (Seiple *et al.*, 1986; Binns & Margrain, 2006) e multifocal (Hood, 2000) e a adaptometria ao escuro (Jackson *et al.*, 2014b, 2014a), permitem a avaliação objetiva da função retiniana. No entanto, a baixa resolução espacial no ERG dificulta a determinação da origem retiniana das alterações (Zhang *et al.*, 2015). As limitações do reflexo pupilar consistem nas medições do reflexo pupilar que podem ser influenciadas pelos estímulos de luz usados (Adhikari *et al.*, 2015), sexo (Fan *et al.*, 2009), idade (Straub *et al.*, 1992) e cor da íris (Bergamin *et al.*, 1998). Alterações no tamanho da pupila também são observadas em resposta a outros estímulos, incluindo padrões de estrutura espacial (Slooter & van Norren, 1980) e também a uma série de estressores emocionais e cognitivos (Hall & Chilcott, 2018). Apesar dessas técnicas separadamente não serem efetivas para avaliar as alterações retinianas, quando combinadas, podem fornecer dados confiáveis sobre as alterações neuronais da retina.

1.4. Justificativa do Estudo

A DMRI está relacionada a alterações maculares, área responsável pela acuidade visual e visão de cores. Dessa forma, testes que avaliem a resposta macular podem auxiliar no diagnóstico e acompanhamento dos pacientes com DMRI. Diversos estudos usaram testes de visão de cores a fim de avaliar alterações funcionais em pacientes com DMRI, alguns usando testes de arranjo (Applegate *et al.*, 1987; Frennesson *et al.*, 1995; Feigl *et al.*, 2005) e outros avaliações computadorizadas (Holz *et al.*, 1995; Arden, 2004; Downie *et al.*, 2014; Vemala *et al.*, 2017).

Além de evitar os vieses envolvidos nos julgamentos subjetivos dos testes de arranjo, o CCT apresenta maior sensibilidade que este outro tipo de teste de visão de cores (Ventura *et al.*, 2005). Ele também apresenta vantagens em relação a outros testes computadorizados, como o CAD, por exemplo. O tempo de aplicação do CCT é muito menor, fato que apresenta vantagem na aplicação clínica do teste.

O CCT tem sido aplicado na avaliação de diversas condições como, por exemplo, doença de Parkinson (Regan *et al.*, 1998), atrofia óptica dominante (Simunovic *et al.*, 1998), diabetes (Ventura *et al.*, 2003), neuropatia óptica de Leber (Gualtieri *et al.*, 2004; Ventura *et al.*, 2007) distrofia muscular de Duchenne (Costa *et al.*, 2004); e glaucoma (Castelo-Branco *et al.*, 2004). Contudo, o CCT ainda não foi aplicado em pacientes com DMRI.

Dessa forma, este trabalho apresenta uma avaliação inédita, mais quantitativa e clinicamente viável do desempenho da visão de cores em pacientes com DMRI.

Com relação ao uso do reflexo pupilar à luz para avaliação de fotorreceptores na DMRI, Maynard e colaboradores mostraram alterações na atividade das ipRGCs em pacientes com DMRI. Contudo, além de pacientes com DMRI classificados como AREDS 2, também foram incluídos pacientes com classificação AREDS 3 (Maynard *et al.*, 2015). No presente estudo, selecionamos apenas pacientes com classificação AREDS 2, portanto, as respostas obtidas referem-se a pacientes em um estágio inicial da doença, o que torna a amostra mais homogênea.

Dessa forma, avaliamos as alterações da visão de cores através de uma técnica mais sensível e ainda não aplicada em pacientes com DMRI, bem como a realização dos exames psicofísicos e eletrofisiológicos em pacientes com a fase inicial da doença. Outro diferencial deste trabalho é a correlação dos resultados obtidos pelos testes visuais com os achados no OCT, dado importante já que Curcio e colaboradores em seus estudos sugeriram que a degeneração e perda de fotorreceptores ocorre antes de alterações no complexo epitélio pigmentado-membrana de Bruch (Curcio *et al.*, 1996; Curcio, 2001).

Além disso, a abordagem do uso de diferentes testes que avaliem a integridades dos fotorreceptores nos estágios iniciais na DMRI, não utilizados na prática clínica, podem fornecer dados relevantes não somente sobre a fisiopatologia da doença assim como ampliar a avaliação diagnóstica nesses estágios impactando na qualidade de vida deste grupo de pacientes e no acompanhamento clínico prospectivo destes casos.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Investigar o impacto da DMRI seca inicial em funções mediadas pelos fotorreceptores da retina externa (cones e bastonetes) e interna (células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis) no contexto de alterações morfológicas da retina.

Objetivos específicos

Realizar a avaliação funcional dos fotorreceptores cones, bastonetes e células ganglionares de pacientes portadores de DMRI seca inicial e controles através da avaliação da visão de cores, do reflexo pupilar à luz e do ERG.

Examinar a relação entre as respostas dos testes visuais aos parâmetros da Tomografia de Coerência Óptica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Participantes

Os participantes foram selecionados no Núcleo de Oftalmologia da Prevent Senior[®], seguindo os critérios de inclusão descritos abaixo e, então, convidados a participar voluntariamente da pesquisa. Os participantes foram submetidos a uma avaliação oftalmológica completa, incluindo medida de acuidade visual com melhor correção, biomicroscopia de segmento anterior, medida da pressão intraocular, biomicroscopia de fundo, angiofluoresceinografia e OCT. A seleção dos pacientes seguiu conforme os critérios descritos abaixo:

Grupo controle

Critério de inclusão:

1. Sem alteração macular;
2. Ausência de catarata;
3. Ausência de suspeita de glaucoma;
4. Acuidade visual de até 20/30;

Critério de exclusão:

1. Cirurgia oftalmológica prévia;
2. Diabetes;
3. Tabagismo;
4. Uso de antidepressivos, sedativos-hipnóticos, opióides;
5. Uso de imunossupressores;
6. Uso de medicamentos cuja ação comprovadamente altere a estrutura ou funcionalidade do sistema visual;

Grupo DMRI

Critério de inclusão:

1. Diagnóstico de DMRI, segundo AREDS 2, com múltiplas drusas pequenas ou poucas drusas de tamanho intermediário (63 – 124 μm de diâmetro) ou alteração pigmentar e ausência de exsudatos e atrofia geográfica;
2. Ausência de catarata;
3. Ausência de suspeita de glaucoma;
4. Acuidade visual de até 20/30;

Critério de exclusão:

1. Cirurgia oftalmológica prévia;
2. Diabetes;
3. Tabagismo;
4. Uso de antidepressivos, sedativos-hipnóticos, opióides;
5. Uso de imunossupressores;
6. Uso de medicamentos cuja ação comprovadamente altere a estrutura ou funcionalidade do sistema visual;

Após a triagem, os pacientes foram encaminhados ao Laboratório de Eletrofisiologia e Psicofísica Visual Clínica do Departamento de Psicologia Experimental do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo onde, após a leitura e assinatura do termo de consentimento livre esclarecido (TCLE – **Apêndice A**), procedeu-se à realização da avaliação da função visual.

Este projeto foi realizado com aprovação do comitê de ética do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo, número 2.065.527 (**Apêndice B**), bem como no comitê de ética da Prevent Sênior, número 4.01.N.2016.12.01.

3.2. Visão de Cores

3.2.1. *Cambridge Colour Test (CCT)*

Para a avaliação do limiar de discriminação de cores, foi utilizado o *Cambridge Colour Test* (CCT). O teste foi realizado utilizando um computador Dell (Dell Dimension XTC) que enviava o estímulo a uma placa gráfica VSG 2/5 (Cambridge Research Instruments, Rochester, UK) que, por sua vez, o exibia em um monitor de alta resolução previamente calibrado (Sony G420 Trinitron, Multiscan).

O teste consistiu na identificação do optotipo de Landolt (“C” de Landolt), que foi apresentado a 2,94 metros do participante. Este estímulo foi apresentado em fundo com ruído de cor e forma, impedindo assim que o brilho e o contorno sejam usados como dicas para a discriminação da tarefa (**Figura 19**). A tarefa do participante é identificar a orientação da abertura (abertura para cima, para baixo, esquerda ou direita), que é alterada a cada nova apresentação em um método psicofísico de escolha forçada. Os participantes tiveram 10 segundos para realizarem a escolha da posição da abertura e informar ao examinador que então registrava a escolha do participante através de um controle remoto. A cada acerto do participante a cor do estímulo se aproximava do fundo e, a cada erro, se afastava do fundo no mesmo eixo de apresentação. O limiar foi determinado como o valor médio da 6^a a 11^a reversão, que são os erros cometidos pelo participante avaliado.

Figura 19. Exemplo do estímulo apresentado no CCT. A posição do estímulo muda a cada apresentação de modo aleatório. A cada resposta correta do participante a cromaticidade do estímulo aproxima-se da cromaticidade do fundo e, em uma resposta errada, a diferença cromática entre o estímulo e o fundo aumenta (Gualtieri, 2004).

Foi realizado o protocolo Trivector, que determina os limiares de discriminação cromática nos eixos de confusão Protan, Deutan e Tritan por ser um teste mais rápido, mas não menos eficaz e sensível. Os eixos avaliados por este protocolo no diagrama do espaço de cromaticidade da CIE 1976 estão apresentados na **Figura 20**.

Figura 20. Diagrama do espaço de cromaticidade da CIE 1976 ($u'v'$) e os eixos avaliados no protocolo trivector do Cambridge Colour Test (CCT). (P) Protan. (D) Deutan. (T) Tritan. (Ventura *et al.*, 2007).

Os resultados obtidos no CCT através do protocolo Trivector apresentam os limiares de discriminação cromática para os eixos Protan, Deutan e Tritan e foram analisados por grupo.

3.3. Reflexo pupilar à luz

Para a avaliação da resposta pupilar à luz foi utilizado o sistema Roland, composto por um Ganzfeld (Roland Consult Stasche & Finger GmbH, Brandenburgo, Alemanha), com diodos emissores de luz responsáveis pelo estímulo e por uma câmera infravermelha, capaz de registrar imagens no escuro com alta resolução espacial e temporal, em registro contínuo no modo de gravação em 30 Hz. O protocolo utilizado baseou-se no estudo realizado por Park *et al.* (2011).

Inicialmente, os pacientes foram orientados sobre o teste e, em seguida, adaptados ao escuro por 10 minutos. Após a adaptação, foram realizados os estímulos que consistiram em flashes de luz, de apresentação retangular, ou seja, não apresentaram efeito de aparecimento ou desaparecimento gradual. Os estímulos tiveram comprimento de onda igual a 470 nm com

1 segundo de duração, alternados com flashes de luz com comprimento de onda igual a 631 nm, com a mesma duração.

A luminância dos estímulos, em $\log \text{cd.m}^{-2}$, foi de -3, -2, 2, 2,4 e 2,4 com 0,78 de fundo, para cada comprimento de onda. Foram utilizados o estímulo -3 log para avaliar a resposta dos bastonetes, 2,4 log para a resposta das ipRGCs e 2,4 log com 0,78 de fundo para a resposta dos cones. O estímulo foi apresentado após 5 segundos de registro para a obtenção da linha de base e o diâmetro pupilar foi registrado de forma automatizada por até 64 segundos (**Figura 21**).

Figura 21. Exemplo de medição automática do tamanho pupilar. A medição do tamanho pupilar foi realizada de forma automatizada pelo software RETIpupillometry (v. 7.15.0.1; Roland Consult Stasche & Finger GmbH, Brandenburgo, Alemanha) através de uma câmera infravermelha capaz de registrar imagens no escuro com alta resolução espacial e temporal, em registro contínuo no modo de gravação em 30 Hz.

Após cada estímulo houve um intervalo de 2 minutos para que a pupila retorne ao diâmetro no escuro. Este intervalo foi estipulado com base no trabalho de Park *et al.* (2011) que postulou que 2 minutos são suficientes para que a pupila retorne ao diâmetro de base após um flash de luz de 1 segundo em pacientes normais e previamente adaptados ao escuro por, pelo menos, 10 minutos.

Cada intensidade luminosa pode ser relacionada à dominância de um tipo de fotorreceptor na resposta pupilar, assim, segundo Park *et al.* (2011) as menores intensidades estimulam principalmente os bastonetes e as intensidades mais altas estimulam as células ipRGC. Para a

estimulação dos cones, fez-se necessário um estímulo composto por um flash vermelho após adaptação de 1 minuto a um fundo azul. Dessa forma, nosso protocolo consistiu em nove estímulos.

Após os registros, as curvas foram exportadas e analisadas em script próprio programado no Origin® (OriginLab Pro, v.8.5.1 SR2). A obtenção dos parâmetros para análise dos resultados foi realizada conforme o trabalho de Daluwatte *et al.* (2012). A linha de base foi obtida através da mediana do tamanho pupilar registrado 3 segundos antes do início do estímulo. A latência foi calculada como o tempo do início do estímulo até a constrição máxima da pupila. O tempo de redilatação foi calculado a partir do ponto de constrição máxima da pupila até que a pupila tenha retornado a 75 % de seu tamanho na linha de base. A resposta sustentada foi calculada como a mediana do tamanho pupilar registrado no período de 6 a 8 segundos após do início do estímulo (**Figura 22**). Estes parâmetros foram calculados em todos os estímulos para todos os participantes.

Figura 22. Obtenção dos parâmetros da reflexo pupilar à luz. A linha de base (**B**) é obtida através da mediana do tamanho pupilar registrado 3 segundos antes do início do estímulo. O estímulo (**E**) é realizado durante 1 segundo, com apresentação retangular. A latência (**L**) foi calculada como o tempo do início do estímulo até a constrição máxima da pupila. O tempo de redilatação (**TR**) foi calculado a partir do ponto de constrição máxima da pupila até que a pupila tenha retornado a 75 % de seu tamanho na linha de base. A resposta sustentada (**RS**) foi calculada como a mediana do tamanho pupilar registrado no período de 6 a 8 segundos após do início do estímulo.

Após a obtenção dos parâmetros e curvas de todos os participantes em cada estímulo, foi realizada a curva medida para cada estímulo em cada grupo e procedeu-se à análise estatística de comparação entre os grupos.

3.4. Eletrorretinograma (ERG)

O eletrorretinograma (ERG) foi registrado em um sistema RETIport (Roland Consult) composto por um amplificador e sistema computadorizado de aquisição de sinais, acoplado ao estimulador de campo total – Ganzfeld (Q450SC; Roland Consult), que foi composto por seis conjuntos de diodos emissores de luz com distribuições espectrais diferentes.

A avaliação foi realizada monocularmente, em olho previamente escolhido. Foi então realizada a cicloplegia, com a aplicação de uma gota de tropicamida 1 % (Mydracyl®, Alcon Laboratórios do Brasil LTDA) e anestesia, através da aplicação de uma gota de cloridrato de benoxinato 0.4 % (oxibuprocaina).

Após a indução da cicloplegia e anestesia, procedeu-se à colocação dos eletrodos. 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 eletrodo 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) conectado 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 5 K Ω . Caso a impedância estivesse acima desse valor os eletrodos eram retirados e reposicionados com o mesmo procedimento, até alcançar a impedância ideal.

Após 10 minutos de adaptação ao escuro o participante foi posicionado no Ganzfeld com apoio de queixo e testa do próprio equipamento. O procedimento eletrofisiológico teve duração aproximada de 30 minutos.

3.4.1. Protocolos

O protocolo de *Flicker* heterocromático 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 contra fase de dois comprimentos de onda, quanto a apresentação dessa modulação em duas frequências temporais. A modulação de contraste cromático permite criar um estímulo com 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 (**Figura 23**).

Figura 23. Estímulos do protocolo de *Flicker* Heterocromático e as suas características. A. Representação da luminância do estímulo nas três condições de modulação de contraste entre os LEDs verde e vermelho. **B.** Representação da oponência cromática e de luminância em cada da modulação. **C.** Representação da diferença de luminância nas três condições (Martins, 2018).

O protocolo utilizado incluiu três modulações senodais de contraste entre os LEDs verde e vermelho, que variaram conforme a fórmula:

$$\frac{R}{(R + G)}$$

Onde R é o contraste do LED vermelho e G é o contraste do LED verde. As três modulações foram 0, 0,5 e 1. O LED verde variou em 100 % de contraste e o LED vermelho permaneceu constante quando a modulação foi igual a 0. Os dois 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. A luminância média desses estímulos foi de 2 log cd.m⁻² (**Figura 24**).

Figura 24. Representação do contraste entre o estímulo vermelho (R) e o verde (G) nas modulações 0, 0,5 e 1. (A) O LED verde variou em 100 % de contraste e o LED vermelho permaneceu constante quando a modulação foi igual a 0. **(B)** Ambos estímulos variaram em 50 % de contraste quando a modulação foi igual a 0,5. **(C).** O estímulo vermelho variou em 100 % e o LED verde permaneceu constante quando a modulação foi igual a 1. Luminance: luminância; Time: tempo (Martins, 2018).

As três modulações foram apresentadas em 12 Hz (via de oponência cromática) e em 36 Hz (via de luminância). Os estímulos foram apresentados 20 vezes para cada frequência, sendo que a resposta final foi a média dessas apresentações.

3.4.2. Processamento dos dados

Os resultados do eletroretinograma de *flicker* heterocromático foram analisados através da análise de Fourier. Para gerar os valores de amplitude e fase foram utilizados o primeiro e o segundo harmônicos. A relação sinal-ruído (S/R) foi avaliada nas duas frequências temporais de acordo com a fórmula aplicada nos valores da amplitude:

$$S/R = \frac{F}{\left(\frac{(F+1) + (F-1)}{2}\right)}$$

Onde F é a frequência temporal fundamental, (F+1) é a frequência temporal acima da fundamental e (F-1) é a frequência temporal abaixo da fundamental. Os resultados foram rejeitados se o valor da relação sinal-ruído foi menor que 2.

3.1. Tomografia de Coerência Óptica (OCT)

Após dilatação do olho a ser examinado, foi realizado a tomografia do nervo óptico e da mácula em todos os pacientes. Os exames de OCT foram realizados utilizando um tomógrafo de coerência ótica de alta definição (Cirrus™ HD OCT, modelo 4000; Carl Zeiss Meditec, Dublin, CA, USA). Este equipamento utiliza a tecnologia de tomografia ótica da coerência do domínio espectral, utilizando um diodo super luminescente de 840 nm, com poder óptico menor que 725 µW na córnea, realizando 27,000 varreduras por segundo em uma profundidade de 2 mm no tecido (1024 pontos) com resolução axial e transversal de 5 e 15 µm (no tecido), respectivamente. As imagens são adquiridas através de software próprio do fabricante, Cirrus™ HD OCT. As imagens foram aceitas quando a qualidade do sinal captado foi de pelo menos 60 %. As medidas quantitativas da espessura macular (em µm) e do volume cúbico macular, bem como a análise qualitativa da presença de depósitos drusenóides, integridade do complexo EPR-Bruch-Coriocapilar e da integridade da camada de fotorreceptores foram correlacionadas com os resultados dos exames da avaliação funcional do sistema visual.

3.2. Análise Estatística

Para cada avaliação, os dados obtidos foram analisados para a identificação e remoção de *outliers* através do teste ROUT (do inglês, *Robust regression and Outlier removal*), com valor de $Q = 5$, não admitindo mais que 5 % dos *outliers* identificados sejam falsos. Os dados restantes foram testados quanto a normalidade através do teste D'Agostino-Pearson. Os dados considerados como tendo distribuição não-normal serão analisadas através do teste Mann-Whitney e os dados com distribuição normal foram analisados através do teste t de Student para mostras independentes.

Os resultados foram correlacionados com os parâmetros qualitativos do OCT, como presença de depósitos drusenóides, integridade do complexo epitélio pigmentado – membrana de Bruch – coriocapilar e integridade da camada de fotorreceptores. Os resultados foram obtidos através de correlações de Spearman, sendo consideradas significativas quando $p < 0.05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Pacientes

Neste trabalho, foram incluídos 49 participantes, 19 no grupo Controle e 30 no grupo DMRI. As médias dos valores demográficos podem ser observadas na **Tabela 2**.

Tabela 2. Tabela de dados demográficos por grupo com média e desvio padrão da espessura e volume cúbico macular.

	Controle	DMRI	<i>p</i>
Idade (anos)	71,6 ± 4,8	69,0 ± 7,5	0,2325
Sexo (%)	M 47,3	M 26,6	0,2179
	F 52,6	F 73,3	
Espessura Macular (µm)	238,7 ± 46,63	253,7 ± 36,09	0,7263
Volume Cúbico Macular (mm³)	10,18 ± 0,4147	10,09 ± 0,5890	0,7937

Os participantes foram pareados por idade, não sendo encontrado diferença significativa para as idades dos pacientes ($p = 0,2325$) entre os grupos Controle e DMRI.

Os valores individuais com os parâmetros avaliados pelo OCT estão apresentados na **Tabela 3**.

Tabela 3. Valores individuais dos parâmetros avaliados pelo OCT.

Participante	Grupo	Idade	Sexo	AV	EM (μm)	VCM (mm^2)	PDD	IC	ICF
1	Controle	73	Feminino	20/25	274	10,6	-	-	-
2	Controle	77	Masculino	20/25	-	-	-	-	-
3	Controle	67	Masculino	20/20	-	-	-	-	-
4	Controle	77	Masculino	20/20	263	10,5	Preservada	Preservada	Preservada
5	Controle	74	Masculino	20/25	123	9,7	Preservada	Preservada	Preservada
6	Controle	66	Feminino	20/20	256	10,7	Preservada	Preservada	Preservada
7	Controle	68	Masculino	20/20	261	9,7	Preservada	Preservada	Preservada
8	Controle	67	Feminino	20/25	238	9,6	Preservada	Preservada	Preservada
9	Controle	71	Feminino	20/20	-	-	-	-	-
10	Controle	70	Masculino	20/25	-	-	-	-	-
11	Controle	69	Masculino	20/20	-	-	-	-	-
12	Controle	78	Masculino	20/25	-	-	-	-	-
13	Controle	68	Feminino	20/25	249	10,2	Preservada	Preservada	Preservada

14	Controle	76	Feminino	20/25	-	-	Preservada	Preservada	Preservada
15	Controle	69	Feminino	20/20	-	-	-	-	-
16	Controle	64	Feminino	20/20	-	-	-	-	-
17	Controle	82	Masculino	20/30	217	10,3	Preservada	Preservada	Preservada
18	Controle	71	Feminino	20/20	-	-	-	-	-
19	Controle	75	Feminino	20/25	267	10,3	Preservada	Preservada	Preservada
20	DMRI	78	Masculino	20/25	273	10,6	Alterada	Alterada	Preservada
21	DMRI	78	Feminino	20/20	-	-	-	-	-
22	DMRI	77	Feminino	20/30	217	10,2	-	-	-
23	DMRI	60	Masculino	20/25	229	10,1	Preservada	Preservada	Preservada
24	DMRI	66	Feminino	20/20	277	11,1	Alterada	Alterada	Alterada
25	DMRI	64	Feminino	20/25	254	9,7	Preservada	Preservada	Alterada
26	DMRI	77	Feminino	20/25	-	-	Alterada	Alterada	Preservada
27	DMRI	64	Masculino	20/25	242	10,4	Preservada	Preservada	Preservada
28	DMRI	66	Feminino	20/25	-	-	-	-	-

29	DMRI	66	Feminino	20/25	252	10,2	Alterada	Alterada	Preservada
30	DMRI	74	Feminino	20/25	257	10,1	Preservada	Alterada	Preservada
31	DMRI	83	Masculino	20/25	291	10,3	Preservada	Preservada	Preservada
32	DMRI	64	Feminino	20/25	283	10,6	Preservada	Preservada	Preservada
33	DMRI	71	Feminino	20/20	253	9,7	Preservada	Preservada	Preservada
34	DMRI	63	Feminino	20/25	256	9,8	Alterada	Alterada	Preservada
35	DMRI	58	Feminino	20/20	220	9,8	Preservada	Preservada	Preservada
36	DMRI	83	Feminino	20/40	240	9,5	Alterada	Alterada	Preservada
37	DMRI	61	Feminino	20/25	308	9,9	Preservada	Preservada	Preservada
38	DMRI	62	Feminino	20/30	338	10,5	Alterada	Alterada	Preservada
39	DMRI	75	Feminino	20/30	242	10,2	Alterada	Alterada	Alterada
40	DMRI	78	Feminino	20/32	250	10,1	Preservada	Preservada	Preservada
41	DMRI	72	Masculino	20/25	249	10,3	Alterada	Alterada	Preservada
42	DMRI	56	Feminino	20/20	178	9,9	Preservada	Preservada	Preservada
43	DMRI	63	Masculino	20/25	266	10,5	Preservada	Preservada	Preservada

44	DMRI	61	Feminino	20/25	235	8,07	Alterada	Alterada	Preservada
45	DMRI	79	Masculino	20/25	244	10,5	Preservada	Preservada	Preservada
46	DMRI	69	Feminino	20/25	269	10,3	Preservada	Preservada	Preservada
47	DMRI	68	Feminino	20/30	167	9	Alterada	Alterada	Alterada
48	DMRI	64	Feminino	20/25	308	10,8	Preservada	Preservada	Preservada
49	DMRI	78	Masculino	20/20	251	10,3	Preservada	Preservada	Preservada

Resultados ausentes (-) significa que não foi possível realizar análise do parâmetro no OCT do paciente.

AV: Acuidade Visual; EM: Espessura macular; VCM: Volume Cúbico Macular; PDD: Presença de Depósitos Drusenóides; IC: Integridade do Epitélio Pigmentado da retina - Membrana de Bruch - coriocapilar; ICF: Integridade da Camada de Fotorreceptores;

4.2. Visão de cores

Ao realizar o protocolo *Trivector* do CCT foi observado um aumento no limiar de discriminação cromática nos três eixos avaliados entre os grupos Controle e DMRI, Protan ($p = 0,0087$), Deutan ($p = 0,0180$) e Tritan ($p = 0,0140$) (**Figura 25**). Embora o eixo Tritan tenha apresentado maior limiar de contraste cromático, o eixo Protan apresentou a maior diferença entre os grupos.

Figura 25. Limiar de discriminação cromática para os eixos Protan, Deutan e Tritan avaliados no Cambridge Colour Test (CCT) no protocolo *trivector*. Foi observada diferenças entre as médias dos grupos Controle e DMRI nos três eixos avaliados, Protan ($p = 0,0087$), Deutan ($p = 0,0180$) e Tritan ($p = 0,0140$).

Os resultados individuais dos pacientes são apresentados na **Tabela 4**.

Tabela 4. Resultados individuais para a discriminação cromática nos eixos Protan, Deutan e Tritan avaliados pelo Cambridge Colour Test (CCT). Os resultados do CCT são apresentados em $u'v' \cdot 10^{-3}$. Os pacientes que não apresentam resultados não realizaram ou não concluíram o teste.

Participante	Grupo	Protan	Deutan	Tritan
1	Controle	30	67	269
2	Controle	124	80	84
3	Controle	112	106	130
4	Controle	75	74	163
5	Controle	29	29	85
6	Controle	60	63	51
7	Controle	55	52	74
8	Controle	39	46	114
9	Controle	42	63	129
10	Controle	58	54	99
11	Controle	46	42	78
12	Controle	-	-	-
13	Controle	40	36	66
14	Controle	46	49	109
15	Controle	92	97	26
16	Controle	52	45	110
17	Controle	48	51	103
18	Controle	44	44	101
19	Controle	38	44	135
20	DMRI	83	88	159
21	DMRI	48	41	152
22	DMRI	81	67	71
23	DMRI	64	70	91

24	DMRI	36	76	263
25	DMRI	72	66	214
26	DMRI	111	125	321
27	DMRI	66	48	84
28	DMRI	-	-	-
29	DMRI	88	85	221
30	DMRI	65	30	79
31	DMRI	35	76	141
32	DMRI	87	65	86
33	DMRI	61	29	58
34	DMRI	104	110	233
35	DMRI	49	46	71
36	DMRI	76	114	183
37	DMRI	39	41	87
38	DMRI	59	63	177
39	DMRI	-	-	-
40	DMRI	63	59	182
41	DMRI	52	74	67
42	DMRI	29	47	57
43	DMRI	50	60	159
44	DMRI	65	52	95
45	DMRI	81	81	227
46	DMRI	48	107	36
47	DMRI	221	123	516
48	DMRI	90	68	144
49	DMRI	96	66	146

Resultados ausentes (-) significa que o paciente não realizou ou não concluiu o teste.

Os resultados obtidos seguem de acordo com outros estudos que, mesmo utilizando outras técnicas, mostraram alterações na visão de cores em pacientes com DMRI seca inicial.

Um trabalho utilizando um sistema computadorizado para o contraste cromático observou diferença na discriminação cromática nos três eixos avaliados, Protan, Deutan e Tritan (Frennesson *et al.*, 1995). Arden (2004) também utilizou um sistema computadorizado e observou alterações apenas no eixo Tritan comparando pacientes com DMRI a participantes controles pareados por idade (Arden, 2004).

Holz e colaboradores, em um trabalho prospectivo de 24 meses com pacientes com alteração na camada de Bruch, utilizando um sistema computadorizado, também encontraram um aumento no limiar restrito ao eixo Tritan (Holz *et al.*, 1995). Alterações na camada de Bruch estão altamente ligadas ao desenvolvimento da DMRI exsudativa. Assim, foi inferido que a redução na discriminação do eixo Tritan pode predizer um pior prognóstico no desenvolvimento da DMRI. Como a concentração dos subtipos de cones não é igual, com os cones M mais numerosos, seguido pelos cones L e cones S, com 64, 33 e 3 % (Ahnelt *et al.*, 1987; Kolb, 2012), respectivamente, é válido pensar que alterações mínimas e/ou seletivas neste último subgrupo poderiam levar a maiores prejuízos na atividade celular e no limiar de discriminação cromática para o eixo Tritan.

No trabalho de Midená e colaboradores usando o teste Farnsworth-Munsell 100, não revelou alterações de discriminação cromática no grupo DMRI comparado ao grupo controle pareado por idade (Midená *et al.*, 1997). Entretanto, outro trabalho utilizando o teste Farnsworth-Munsell 100 juntamente com o teste Panel D-15, encontrou alteração no eixo Tritan, que se agrava com a duração e com o avanço da doença (Applegate *et al.*, 1987). Feigl *et al.*, (2005) também utilizou o teste Panel D-15 e obteve resultados similares, detectando apenas redução na discriminação no eixo Tritan (Feigl *et al.*, 2005).

Utilizando uma técnica de estimulação dos cones em fundo favorável e integrando a distribuição de potência para a obtenção da resposta de cada subtipo, Downie e colaboradores observaram sensibilidade reduzida em canais luminância e de cor, principalmente pela participação dos cones S, sensíveis a comprimentos de onda curtos (Downie *et al.*, 2014).

O teste Cone Contrast foi utilizado por Chandramohan e colaboradores e foi detectado déficit apenas na discriminação cromática do cone L em pacientes com DMRI inicial e

intermediária. Segundo os autores, esse resultado pode ser explicado pelo pequeno tamanho da amostra (10 participantes no grupo controle e 20 com DMRI, 8 no estágio 2 e 12 no estágio 3 da classificação AREDS), ou pela opacificação da lente em alguns dos participantes (Chandramohan *et al.*, 2016).

O desempenho de pacientes assintomáticos, diagnosticados com DMRI seca inicial avaliado no teste CAD (do inglês, *Color Assessment and Diagnosis*) mostrou alterações de visão de cores no eixo vermelho/verde ou amarelo/azul ou em ambos quando comparado com grupo controle pareado por idade, com perdas maiores na discriminação cromática observadas em retinas com pseudodrusas reticulares (Vemala *et al.*, 2017).

Sabemos que, a discriminação cromática tende a melhorar durante a adolescência, mas com a idade as alterações no cristalino e nos meios ópticos levam a um aumento nos limiares de discriminação de luminância e de contraste cromático (Pinckers, 1980; Arden, 2004). Segundo Arden, esta redução no limiar de luminância, por si só, pode levar a alterações nos limiares cromáticos (Arden, 2004). A alteração encontrada no limiar do eixo Tritan por Holz e colaboradores não foi acompanhada de alterações nos eixos Protan e Deutan. A hipótese dos autores para esta seletividade é de que os cones S seriam mais susceptíveis ao dano causado pela DMRI (Holz *et al.*, 1995).

Em pacientes com DMRI intermediária, que apresentaram drusas grandes ou alterações pigmentares, Downie e colaboradores encontraram não só uma redução para a discriminação cromática como também para luminância (Downie *et al.*, 2014). Isto indica que as alterações cromáticas podem anteceder outras alterações no sistema visual. Assim, nossos resultados indicam que o contraste cromático pode ser uma medida para avaliar a progressão da DMRI mesmo antes de manifestações de lesões maculares atróficas ou exsudativas associadas à perda visual.

A **Tabela 5** apresenta um resumo dos trabalhos que realizaram testes de visão de cores em pacientes com DMRI.

Tabela 5. Resumo dos trabalhos com visão de cores em pacientes com DMRI. Os diversos trabalhos envolveram testes de arranjo e testes computadorizados, porém, existem divergências nos resultados quanto as alterações nos eixos Protan e Deutan.

Autor	Amostra	Idade	Teste	Resultado
Applegate <i>et al.</i> , (1987)	3 DMRI	$66 \pm 8,2$	FM-100	Redução da sensibilidade apenas no eixo Tritan
Frennesson <i>et al.</i> , (1995)	29 Controles 27 DMRI	$69,7 \pm 6,4$	D-15 panel	Redução da sensibilidade nos eixos Protan, Deutan e Tritan
Holz <i>et al.</i> , (1995)	84 pacientes (prospectivo)	$68,8 \pm 6,2$	Sistema Computadorizado	Redução da sensibilidade apenas no eixo Tritan
Arden <i>et al.</i> , (2004)	109 Controles 24 DMRI	71,5	Sistema Computadorizado	Redução da sensibilidade apenas no eixo Tritan
Feigl <i>et al.</i> , (2005)	13 Controle 13 DMRI	63-77	Panel D-15 e D-15d	Redução da sensibilidade apenas no eixo Tritan
Downie <i>et al.</i> , (2014)	10 Controles 20 DMRI	72,5	Sistema Computadorizado	Redução da sensibilidade nos eixos Protan, Deutan e Tritan
Vemala <i>et al.</i> , (2017)	90 DMRI	70	CAD	Redução da sensibilidade nos eixos Protan, Deutan e Tritan

Os resultados obtidos no CCT também estão correlacionados aos parâmetros observados no OCT. Observamos uma correlação positiva fraca entre a presença de depósitos drusenóides e o eixo Protan ($p < 0,05$ e $r = 0,385$), e moderada para os eixos Deutan ($p < 0,01$ e $r = 0,595$) e Tritan ($p < 0,01$ e $r = 0,517$). Também há uma correlação fraca entre alterações no complexo epitélio pigmentado – membrana de Bruch – coriocapilar e os eixos Protan ($p < 0,05$ e $r = 0,396$), Deutan ($p < 0,01$ e $r = 0,488$) e Tritan ($p < 0,01$ e $r = 0,448$). Embora os três eixos tenham apresentado alterações, apenas o eixo Tritan apresentou uma correlação positiva fraca com alterações na camada dos fotorreceptores ($p < 0,01$ e $r = 0,435$).

Sabemos que a perda de fotorreceptores indica para um pior prognóstico da DMRI (Curcio, 2001; Bhutto & Lutty, 2012). Embora a correlação desta alteração morfológica com a diminuição da discriminação no eixo Tritan tenha sido fraca, é possível que alterações no eixo azul-amarelo também possam indicar pior prognóstico da DMRI, e ser usado como marcador clínico da evolução da doença. Para esclarecer isso, seriam necessários estudos de seguimento destes pacientes.

De forma geral, parece haver um consenso sobre a redução no limiar do contraste cromático no eixo Tritan na DMRI, porém, os estudos ainda não são conclusivos quando às alterações observadas nos demais eixos. Embora a maioria dos estudos tenha detectado alteração seletiva da visão de cores, restrita ao eixo Tritan (Applegate *et al.*, 1987; Holz *et al.*, 1995; Arden, 2004; Feigl *et al.*, 2005), alguns demonstraram perdas nos três eixos (Frennesson *et al.*, 1995; Downie *et al.*, 2014; Vemala *et al.*, 2017), como o que foi encontrado no presente trabalho. Além disso, a alteração do limiar para os eixos Protan e Deutan teve correlação moderada com a presença de depósitos drusenóides detectados pelo OCT em pacientes com DMRI. Sugerindo que a redução na discriminação no eixo verde-vermelho seja alteração precoce na DMRI.

Deve ser ressaltado que como algumas funções visuais, como por exemplo, sensibilidade ao contraste, acuidade e estereopsia, a visão de cores também é alterada com a idade (Knoblauch *et al.*, 2001; Paramei, 2012; Chandramohan *et al.*, 2016), sendo que o eixo Tritan parece ser o mais afetado pelo envelhecimento (Werner *et al.*, 2010). Porém, os dados obtidos com CCT foram comparados ao grupo controle pareado pela idade, e mesmo assim, as alterações no eixo Tritan foram significativas

Assim, nossos resultados são consistentes com testes de função do cone em pacientes com DMRI inicial, o que sugere que as funções integradas do cone, incluindo sensibilidade ao contraste, visão de cores e a sensibilidade do cone S, são indicadores prognósticos confiáveis da DMRI (Shelley, 2009).

4.3. Reflexo pupilar à luz

Seguindo o protocolo clínico desenvolvido por Park *et al.* (2011) para avaliar a participação dos fotorreceptores na constrição pupilar, a **Figura 26** apresenta a resposta média para os grupos controle e DMRI quando estimulados com $-3 \log \text{cd.m}^{-2}$ a um comprimento de onda igual a 470 nm, responsável por promover uma maior participação dos bastonetes na constrição pupilar.

Figura 26. Resposta pupilar mediada pelos bastonetes. As linhas contínuas representam a média das respostas dos participantes do grupo Controle (em azul) e DMRI (em laranja) e as linhas pontilhadas representam os desvios padrões das médias. A resposta mediada por bastonetes é obtida com estímulo de 470 nm de comprimento de onda e $-3 \log \text{cd.m}^{-2}$ de intensidade. A resposta foi normalizada, para cada grupo, pela média do diâmetro pupilar nos 3 segundos antes do estímulo. É possível observar que as curvas se sobrepõem tanto em amplitude e latência para o pico, quanto na resposta após o estímulo.

A **Figura 27** apresenta a resposta média para o estímulo de $2,4 \log \text{ cd.m}^{-2}$, com comprimento de onda igual a 631 nm, apresentado após adaptação a um fundo com intensidade igual a $0,78 \log \text{ cd.m}^{-2}$, com comprimento de onda igual a 470 nm, responsável por promover uma maior participação dos cones na constrição pupilar.

Figura 27. Resposta pupilar mediada pelos cones. As linhas contínuas representam a média das respostas dos participantes do grupo Controle (em azul) e DMRI (em laranja) e as linhas pontilhadas representam os desvios padrões das médias. A resposta mediada por cones é obtida através de um estímulo de 1 segundo com comprimento de onda igual a 631 nm e luminância de $2,4 \log \text{ cd.m}^{-2}$ após adaptação da retina a um fundo com 470 nm de comprimento de onda e luminância igual a $6 \log \text{ cd.m}^{-2}$ por um minuto. A resposta foi normalizada pela média do diâmetro pupilar nos 3 segundos antes do estímulo. Nota-se a sobreposição das curvas tanto na latência e amplitude como para a resposta após o estímulo.

Como apresentado anteriormente, as células ipRGCs estão relacionadas a manutenção da constrição pupilar e seu pigmento tem absorção próxima em 470 nm. Esta atividade fica mais evidente ao isolarmos a resposta das ipRGCs do reflexo pupilar através de da estimulação em um comprimento de onda que não seja absorvido pelo fotopigmento. Dessa forma, estímulos com a mesma intensidade, mas com comprimento de ondas diferentes são usados como controle na estimulação da atividade das ipRGCs. A **Figura 28** apresenta a diferença a atividade das células ipRGCs na resposta pupilar quando apresentado um estímulo com comprimento de onda de 470 nm (azul) e outro de 631 nm (vermelho).

Figura 28. Exemplo de resposta de mesma intensidade e comprimento de onda diferente na atividade das ipRGCs no reflexo pupilar. No reflexo pupilar, as células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis (ipRGCs) estão relacionadas à manutenção da constrição pupilar. Seu fotopigmento, a melanopsina, tem absorção máxima por volta dos 470 nm (azul), portanto, estímulos fora dessa faixa de comprimentos de onda não irão promover ativação das ipRGCs. A resposta pupilar à luz apresentada em vermelho foi obtida com estímulo de comprimento de onda de 631 nm (linha vermelha) e intensidade igual a $2,4 \log \text{cd.m}^{-2}$ e, desta forma, não apresenta atividade das ipRGCs. Porém, ao estimular com a mesma intensidade, mas com comprimento de onda igual a 470 nm (linha azul) é possível observar a ativação e resposta das ipRGCs através da manutenção da contração pupilar.

Assim, a participação das células ipRGCs na constrição pupilar foi observada no estímulo com intensidade de $2,4 \log \text{cd.m}^{-2}$ em um comprimento de onda igual a 470 nm (**Figura 29**).

Figura 29. Resposta pupilar mediada pelas ipRGCs. As linhas contínuas representam a média das respostas dos participantes do grupo Controle (em azul) e DMRI (em laranja) e as linhas pontilhadas representam os desvios padrões das médias. A resposta mediada pelas células ganglionares fotossensíveis (ipRGCs) é obtida através de um estímulo de 1 segundo com comprimento de onda igual a 470 nm e luminância de $2,4 \log \text{cd.m}^{-2}$. A atividade desta célula é avaliada através da constrição média após 6 a 8 segundos do estímulo. A resposta foi normalizada pela média do diâmetro pupilar nos 3 segundos antes do estímulo. Observamos uma redução na amplitude da resposta para o grupo DMRI quando comparado ao grupo controle.

Os parâmetros obtidos das respostas pupilares para análise comparativa foram a linha de base, a latência, o tempo de redilatação e a resposta sustentada.

Sabe-se que o diâmetro pupilar também diminui com a idade (Arden, 2004), e que diversas doenças que afetam o sistema nervoso central podem alterar o diâmetro pupilar basal. Assim, além de parear os grupos pela idade, é importante observar alterações no diâmetro pupilar no estado basal para descartar qualquer alteração prévia.

A **Figura 30** apresenta o gráfico de comparação da linha de base para os estímulos dos bastonetes, cones e ipRGC.

Figura 30. Linha de base entre Controles e DMRI. Os símbolos representam a média da linha de base dos participantes do grupo Controle (em azul) e DMRI (em laranja) e as barras representam os desvios padrões das médias. A linha de base foi obtida através da média do diâmetro pupilar nos 3 segundos antecedentes ao estímulo, no escuro para os bastonetes e para as ipRGC e sob adaptação de fundo de $0,78 \log \text{cd.m}^{-2}$ em 470 nm para os cones. Não houve diferença na linha de base para os estímulos dos bastonetes ($p = 0,3584$), os cones ($p = 0,1694$) e para as células ipRGCs ($p = 0,6265$).

Os resultados mostram que não houveram diferenças entre a média do pupilar na linha de base antes dos estímulos para avaliação da resposta dos bastonetes ($p = 0,3584$), cones ($p = 0,1694$) e das células ipRGCs ($p = 0,6265$).

Também avaliamos o tamanho pupilar entre o primeiro e o último estímulo dos exames e observou-se que não houve diferença intragrupo, tanto para o grupo controle ($p = 0,6371$) quanto para o grupo DMRI ($p = 0,2319$). Também se observou que não houve diferenças intergrupo ($p = 0,9608$). Esta análise permitiu observar se o tempo de intervalo entre um estímulo e outro foi suficiente para a recuperação ao estado basal e se os grupos respondiam igualmente a esta recuperação.

A latência para o pico da resposta para cada tipo de fotorreceptor está apresentada na **Figura 31**. Conforme observado, não houve diferenças na latência entre os grupos, para os estímulos aos bastonetes ($p = 0,4435$), cones ($p = 0,0622$) e ipRGC ($p = 0,8573$).

Figura 31. Latência para o pico da constrição pupilar para a resposta dos fotorreceptores. A latência foi observada como o tempo entre o início do estímulo e o tempo para atingir o menor valor de constrição pupilar. Observou-se não haver diferença entre os grupos para nenhum dos estímulos dos fotorreceptores, bastonetes ($p = 0,4435$), cones ($p = 0,0622$) e ipRGC ($p = 0,8573$).

O tempo de latência é um parâmetro simples, mas que pode dizer muito da fisiologia intracelular dos neurônios da retina, uma vez que a latência é dependente da cascata de fototransdução dos fotorreceptores e envio dos sinais pela retina neuronal. Assim, quando colocados lado a lado, os parâmetros acabam sendo observados como controles uns dos outros, uma vez que, se observada uma alteração em apenas um tipo celular, é possível identificar que este tipo celular apresenta alguma alteração no envio dos sinais. Porém, se fossem observadas alterações em todos os tipos celulares, seria possível que as alterações fossem mediadas pelo sistema nervoso autônomo (Bergamin & Kardon, 2003).

Outro parâmetro avaliado foi a amplitude da resposta, que diz respeito a capacidade do estímulo a um grupo celular de promover constrição pupilar. Não observamos alterações para cones ($p = 0,8805$) e bastonetes ($p = 0,5104$). Porém, a resposta das ipRGCs no grupo DMRI

se mostrou significativamente menor quando comparado ao grupo controle ($p = 0,0384$; **Figura 32**).

Figura 32. Amplitude da constrição pupilar para os estímulos para bastonete, cone e ipRGC. A amplitude é a constrição máxima da pupila dividida pela linha de base. Não houve diferença entre os grupos para os estímulos dos bastonetes ($p = 0,8805$) e cones ($p = 0,5104$). Porém, foi observada uma redução na amplitude da resposta ao estímulo para ipRGC ($p = 0,0384$).

Embora não seja usualmente um parâmetro observado nos estímulos para ipRGC, uma vez que ainda não se sabe exatamente quais os grupos celulares que estão participando da fase inicial da constrição pupilar, é interessante observar esta resposta. Observando a **Figura 28** é possível notar que a amplitude da resposta para o estímulo em $2,4 \log \text{cd.m}^{-2}$ no comprimento de onda igual a 470 nm produz uma resposta maior que as observadas nos estímulos para os bastonetes (**Figura 26**) e cones (**Figura 27**). Assim, a hipótese é que as ipRGCs também participem da fase inicial da constrição pupilar neste estímulo. Este padrão, de maior amplitude de resposta em estímulos para ipRGC, também foi observado nos trabalhos de Park & McAnany (2015) e Park *et al.* (2011) em sujeitos saudáveis, contudo, observamos uma redução da amplitude nos pacientes com DMRI quando comparado aos controles.

Esta redução na amplitude do estímulo para as ipRGCs também foi encontrada em pacientes portadores de glaucoma primário de ângulo aberto (GPAA) moderado e avançado, não sendo observada nos sujeitos do grupo GPAA leve (Duque-Chica *et al.*, 2018). Maynard e colaboradores, mesmo utilizando outro tipo de estímulo também observaram redução na amplitude da resposta nos estímulos para as células ipRGCs em pacientes com DMRI intermediária (AREDS 2 e 3) (Maynard *et al.*, 2015). Uma hipótese para resposta é que a amplitude neste estímulo apresente contribuição dos outros fotorreceptores, principalmente dos cones. Contudo, a amplitude para este estímulo foi maior que a amplitude obtida no estímulo para os cones. Dessa forma, acreditamos que as ipRGCs também participem da amplitude da resposta para o estímulo, uma vez que estímulos de mesma intensidade mas comprimentos de onda diferente, produzem respostas com amplitudes diferentes, como observado na **Figura 28**. Portanto, esta redução na amplitude poderia indicar alterações na atividade da ipRGCs mesmo sem alterações na resposta sustentada.

O tempo de recuperação de 75 % do tamanho inicial da pupila é um parâmetro mais voltado à observação de alterações no sistema nervoso simpático, envolvido na redilatação pupilar. Observamos que não houve diferença no tempo de recuperação entre os grupos, em nenhum dos estímulos, bastonetes ($p = 0,4864$), cones ($p = 0,6055$) e ipRGC ($p = 0,0679$; **Figura 33**).

Figura 33. Tempo para recuperação de 75 % do diâmetro pupilar de base. O tempo de recuperação de 75 % do tamanho inicial da pupila é um parâmetro mais voltado a observação de alterações no sistema nervoso simpático. Não foi observado diferenças no tempo de recuperação para nenhum dos estímulos dos bastonetes ($p = 0,4864$), cones ($p = 0,6055$) e ipRGC ($p = 0,0679$).

Um aumento na atividade simpatomimética devido ao aumento da sinalização de noradrenalina e serotonina leva a midríase e redução no tempo de recuperação do reflexo pupilar (Hall & Chilcott, 2018). Por outro lado, pacientes com lesão cerebral traumática leve apresentaram um tempo de recuperação aumentado, mesmo para estímulos de baixa luminância, de aproximadamente 3 cd.m^{-2} (Urosevich & Capo-Aponte, 2013). Os dados do presente estudo sugerem não haver alterações no sistema simpático dos pacientes com DMRI inicial.

A atividade das células ipRGC é avaliada através do parâmetro de resposta sustentada, também designada como resposta pupilar pós iluminação (em inglês, *post illumination pupil response*) (Adhikari *et al.*, 2015). Contudo, não observamos diferenças na resposta sustentada quando comparamos as respostas entre os grupos ($p = 0,1540$; **Figura 34**).

Figura 34. Resposta sustentada. A resposta sustentada é o parâmetro utilizado para avaliar a atividade das células ipRGCs. O parâmetro é obtido como a média da constrição pupilar entre 6 e 8 segundos após um estímulo de 1 segundo com comprimento de onda igual a 470 nm e luminância de $2,4 \log \text{cd.m}^{-2}$. Não foi observada diferença na resposta sustentada pelas ipRGCs entre os grupos ($p = 0,1540$).

Este resultado contraria estudos que mostraram alterações na atividade das células ipRGC em pacientes com DMRI (Maynard *et al.*, 2015). Contudo, os procedimentos e os estímulos usados naqueles trabalhos variam substancialmente em relação ao estímulo utilizado por Park e colaboradores, seguido também neste trabalho (Park *et al.*, 2011). Estes estudos que apresentaram diferenças na atividade das ipRGCs empregaram um estímulo senoidal com frequência de 0,5 Hz, apresentando 6 ciclos em 11,9 segundos, 464 nm de comprimento de onda, fornecendo irradiância retiniana igual a $14,5 \log \text{quanta.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e $14,9 \log \text{quanta.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$ para o estímulo referência, de comprimento de onda igual a 638 nm.

Contudo, no mesmo trabalho de Park e colaboradores, foram comparados tempos diferentes de apresentação dos estímulos e, concluiu-se que a apresentação do estímulo por 1 segundo apresenta melhor relação tempo de estímulo para resposta sustentada (6 segundos após o término do estímulo), usualmente avaliado como atividade da melanopsina (Park *et al.*, 2011).

Também houve diferença no procedimento quanto aos pacientes avaliados. Maynard *et al.* (2015) realizou a indução de cicloplegia com a utilização de Tropicamida 1 % (Minims, Chauvin Pharmaceuticals Ltd., Romford, UK) nos pacientes previamente a realização da avaliação pupilométrica, enquanto no protocolo desenvolvido por Park *et al.* (2011) não houve indução de cicloplegia. O número de sujeitos avaliados também é diferente entre os trabalhos, enquanto Maynard e colaboradores avaliaram 20 pacientes com DMRI e 20 sujeitos controle, avaliamos neste trabalho 19 controles e 30 no grupo DMRI. , a diferença principal reside na seleção do pacientes, em que Maynard e colaboradores além dos pacientes com classificação 2 do AREDS, também selecionaram pacientes com a classificação 3, que inclui pacientes com diversas drusas intermediárias ou, ao menos, uma drusa grande ($> 124 \mu\text{m}$ de diâmetro), ou seja, pacientes com quadro mais avançado da doença que o examinado no presente estudo, e estes pacientes foram responsáveis por 35 % do total de sujeitos do grupo DMRI.

A pupilometria cromática mostra-se como uma tecnologia promissora para o diagnóstico não invasivo para uma série de condições e patologias. No entanto, há algumas limitações que exigem consideração e mais pesquisas para permitir sua implementação em ambientes clínicos. A existência de muitos fatores intrínsecos e extrínsecos que influenciam o reflexo pupilar, como, sexo (Fan *et al.*, 2009), idade (Straub *et al.*, 1992) e cor da íris (Bergamin *et al.*, 1998), diferentes estímulos, incluindo padrões de estrutura espacial, (Slooter & van Norren, 1980; Adhikari *et al.*, 2015) podem levar a variações inter e intra exames, fatores estes a serem sempre observados nas avaliações (Wilhelm, 2011). Portanto, é fundamental que protocolos padronizados sejam desenvolvidos para permitir o uso da pupilometria como uma ferramenta diagnóstica e fatores limitantes devem ser considerados como covariáveis ou critérios de exclusão em estudos do reflexo pupilar à luz para permitir comparações entre estudos (Wang *et al.*, 2016).

Outra limitação desta técnica no presente contexto está relacionada à sua sensibilidade, uma vez que alterações nos cones foram detectadas pelo CCT, porém, estas alterações não foram detectadas na pupilometria, exceto pela redução na amplitude da resposta ao estímulo de $2,4 \text{ cd.m}^{-2}$ em 470 nm nos pacientes com DMRI.

Pesquisas adicionais também são necessárias para estabelecer se as mudanças observadas no reflexo pupilar à luz associadas a diferentes distúrbios são suficientes em termos de especificidade e sensibilidade para serem usadas diagnosticamente. No entanto, a facilidade de

uso, a natureza não invasiva e o baixo custo do reflexo pupilar à luz facilitam sua inclusão em avaliações para diagnóstico precoce e poderiam complementar outros exames na busca de pacientes em grupos de risco do desenvolvimento de algumas patologias. Hall e Chilcott sugerem a aplicação da pupilometria cromática para avaliação diversas condições, incluindo alterações neurodegenerativas (Hall & Chilcott, 2018).

4.4. Eletrorretinograma (ERG)

O ERG foi usado para avaliar as vias cromática e de luminância através do protocolo de *flicker* heterocromático na frequência temporal de 12 e 36 Hz, respectivamente.

A **Figura 35** apresenta o resultado gráfico da amplitude para o 1º harmônico da frequência temporal de 12 Hz nas três modulações de estímulos testadas.

Figura 35. Média da amplitude do 1º harmônico em 12 Hz para os grupos Controle e DMRI. Os símbolos representam a média dos grupos e as barras o desvio padrão. O estímulo de 12 Hz promove ativação da via cromática. Porém, não foi possível observar diferenças significativas na amplitude das respostas entre os grupos para as modulações 0 ($p = 0,4731$), 0,5 ($p = 0,1543$) e 1 ($p = 0,4769$).

Ao analisarmos os resultados, não observamos diferenças significativas na amplitude das respostas do 1º harmônico na frequência de 12 Hz entre os grupos para as modulações 0 ($p = 0,4731$), 0,5 ($p = 0,1543$) e 1 ($p = 0,4769$).

A **Figura 36** apresenta o resultado gráfico da média da fase para o 1º harmônico da frequência temporal de 12 Hz nas três condições testadas.

Figura 36. Média da fase da resposta do 1º harmônico da frequência temporal de 12 Hz. Os símbolos representam a média dos grupos para a fase das repostas e as barras representam os desvios padrões das repostas. O estímulo de 12 Hz promove ativação da via cromática. Observa-se que o grupo DMRI tem um leve atraso de fase no estímulo de modulação 0, porém, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos na fase das repostas para as condições 0 ($p = 0,1831$), 0,5 ($p = 0,6404$) e 1 ($p = 0,4939$).

Assim como na amplitude, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos na fase das respostas do 1º harmônico na frequência de 12 Hz entre os grupos para as modulações 0 ($p = 0,1831$), 0,5 ($p = 0,6404$) e 1 ($p = 0,4939$).

A amplitude do 2º harmônico da frequência temporal de 12 Hz para as três modulações do estímulo está apresentada na **Figura 37**.

Figura 37. Média da amplitude do 2º harmônico da frequência de 12 Hz para os grupos Controle e DMRI. Os símbolos representam a média dos grupos para a amplitude das repostas e as barras representam os desvios padrões das repostas. O estímulo de 12 Hz promove ativação da via cromática. O grupo DMRI apresentou amplitude de resposta levemente maior na condição 1, mas sem apresentar diferença estatística tanto para a condição 1 ($p = 0,1780$), quanto para 0,5 ($p = 0,4054$) e 0 ($p = 0,6637$).

O grupo DMRI apresentou amplitude de resposta levemente maior na condição 1, porém, assim como no 1º harmônico, não observamos diferenças estatísticas para a amplitude das repostas nas condições 0 ($p = 0,6637$), 0,5 ($p = 0,4054$) e 1 ($p = 0,1780$).

É possível observar que as respostas dos grupos são similares tanto para a amplitude quanto para a fase das repostas em todas as condições testadas na frequência de 12 Hz. A análise estatística não identificou diferenças entre os grupos, Controle e DMRI, nas amplitudes ou fases das respostas nas condições testadas na frequência de 12 Hz.

O estímulo de 36 Hz promove ativação da via de luminância. A **Figura 38** apresenta o gráfico da amplitude da resposta nas modulações 0, 0,5 e 1.

Figura 38. Média da amplitude do 1º harmônico da frequência de 36 Hz para os grupos Controle e DMRI. Os símbolos representam a média dos grupos para a amplitude das repostas e as barras representam os desvios padrões das repostas. O estímulo de 36 Hz promove ativação da via de luminância. Ao compararmos as respostas dos grupos, observamos não haver diferença estatística entre as amplitudes das respostas aos estímulos modulados em 36 Hz nas modulações 0 ($p = 0,6142$), 0,5 ($p = 0,8408$) e 1 ($p = 0,9203$).

Observa-se que as amplitudes das respostas dos grupos são similares e ao realizarmos os testes estatísticos não observamos diferenças para as condições 0 ($p = 0,6142$), 0,5 ($p = 0,8408$) e 1 ($p = 0,9203$).

A **Figura 39** apresenta a média da fase para a resposta do 1º harmônico para as modulações de estímulo em 36 Hz.

Figura 39. Média da fase do 1º harmônico da frequência temporal de 36 Hz. Os símbolos representam a média dos grupos para a amplitude das repostas e as barras representam os desvios padrões das repostas. O estímulo de 36 Hz promove ativação da via de luminância. Não foi observada diferenças significativas entre os grupos nos estímulos de modulação 0 ($p = 0,6471$), 0,5 ($p = 0,8935$) e 1 ($p = 0,3009$).

Assim como para a amplitude da resposta em 36 Hz, também não houveram diferenças significativas para a fase das respostas nas condições 0 ($p = 0,6471$), 0,5 ($p = 0,8935$) e 1 ($p = 0,3009$). Nesta frequência, a amplitude e fase são dependentes do contraste do verde e do vermelho e, embora tenhamos encontrado alterações na visão de cores no eixo verde-vermelho, não foi observada alteração para a via de luminância.

Ao correlacionar os resultados do ERG com os parâmetros do OCT, encontramos uma correlação fraca e negativa entre a amplitude do estímulo de 36 Hz na modulação 0,5 e alterações na camada de fotorreceptores. Em outras palavras, alterações na camada dos fotorreceptores levam a uma redução na amplitude da resposta, que é mediada pela via de luminância.

Embora não tenham sido observadas diferenças para as vias cromática e de luminância em pacientes com DMRI, o protocolo de *flicker* heterocromático é sensível para detectar alterações nessas vias em pacientes com glaucoma, como demonstrado por Barboni e colaboradores, que detectaram alterações de fase no primeiro e segundo harmônicos em pacientes perimétricos no estímulo de 12 e 36 Hz quando comparados aos controles. Em pacientes pré-perimétricos, observou-se apenas alterações na fase do segundo harmônicos do estímulo de 36 Hz (Barboni *et al.*, 2011).

Porém, uma limitação quanto ao protocolo foi sua realização em campo total, uma vez que a resposta pode ser atenuada pela atividade dos fotorreceptores da periferia. Como a principal área afetada da DMRI é a mácula, sugerimos a utilização de um menor ângulo de estimulação, com objetivo de obter resposta exclusivamente macular. Foi encontrado que a fase e amplitude do estímulo de 12 Hz são dependentes de um estímulo com ângulo menor que 10°. Já o estímulo de 36 Hz apresenta um perfil oposto, tendo sua amplitude dependente do maior ângulo de estimulação (Jacob *et al.*, 2015; Martins *et al.*, 2016). Estes dados têm como base a distribuição dos fotorreceptores na retina, os cones, que participam do contraste cromático, e são estimulados a 12 Hz, estão mais concentrados na fóvea, o centro da mácula, portanto, um menor grau de estimulação obteremos maior dependência desses fotorreceptores. Por outro lado, a via de luminância, estimulada em 36 Hz, apresenta uma maior dependência dos bastonetes, que têm maior densidade na retina periférica.

As respostas do ERG de *flicker* heterocromático fornecem resultados da atividade funcional das vias de luminância e de oposição dos cones através de uma técnica não invasiva e não sensível aos efeitos da idade (Barboni *et al.*, 2011). Contudo, é importante observar o local de estimulação na retina a fim de se obter melhores respostas dos tipos de fotorreceptores. Assim, a hipótese é de que a estimulação a aproximadamente, 20 graus da fóvea, possa obter melhores respostas, revelando alterações encontradas também na visão de cores.

Contudo, este trabalho é pioneiro na aplicação do protocolo de *flicker* heterocromático em pacientes com DMRI e outros trabalhos são necessários para a comparação e discussão dos achados.

5. CONCLUSÕES

Em conclusão, não foram observadas alterações funcionais nos fotorreceptores avaliados pelo ERG usando o protocolo de *flicker* heterocromático, apontando para a preservação da integridade das vias magno- e parvocelulares.

A pupilometria cromática também não revelou alterações no sistema nervoso autônomo dos pacientes com DMRI. Da mesma forma, não houve alterações nas respostas pupilares mediadas por cones e bastonetes. Porém, houve uma redução significativa na amplitude da resposta para o estímulo azul de alta luminância, o mesmo usado para detectar a resposta das células ipRGCs, sugerindo possível alteração na contribuição das respostas das ipRGCs para a constrição máxima pupilar neste estímulo.

Além disso, o presente estudo mostrou perda na discriminação de cores nos eixos Protan, Deutan e Tritan na fase inicial da DMRI. Estes resultados sugerem que o CCT seja um teste sensível para detectar alterações na discriminação cromática de forma precoce na DMRI. Observamos também correlação positiva entre a presença de depósitos drusenóides e os limiares nos eixos Protan, Deutan e Tritan. Estes resultados de discriminação cromática também apresentaram correlação positiva com alterações no complexo epitélio pigmentado – membrana de Bruch – coriocalilar. Contudo, apenas as perdas no eixo Tritan estão correlacionadas positivamente com alterações na camada dos fotorreceptores.

Portanto, o estudo mostrou que alterações visuais dos pacientes portadores de DMRI podem ser detectadas no desempenho da tarefa de discriminação de cores e que essas perdas se correlacionam com os parâmetros morfológicos obtidos no OCT.

6. Bibliografia

- Abdelsalam A, Del Priore L & Zarbin MA (1999). Drusen in Age-Related Macular Degeneration. *Surv Ophthalmol* **44**, 1–29.
- Adamis AP, Miller JW, Bernal M-T, D’Amico DJ, Folkman J, Yeo T-K & Yeo K-T (1994). Increased Vascular Endothelial Growth Factor Levels in the Vitreous of Eyes With Proliferative Diabetic Retinopathy. *Am J Ophthalmol* **118**, 445–450.
- Adams MKM, Simpson JA, Aung KZ, Makeyeva GA, Giles GG, English DR, Hopper J, Guymer RH, Baird PN & Robman LD (2011). Abdominal Obesity and Age-related Macular Degeneration. *Am J Epidemiol* **173**, 1246–1255.
- Adhikari P, Pearson CA, Anderson AM, Zele AJ & Feigl B (2015). Effect of Age and Refractive Error on the Melanopsin Mediated Post-Illumination Pupil Response (PIPR). *Sci Rep* **5**, 17610.
- Aguilar M & Stiles WS (1954). Saturation of the Rod Mechanism of the Retina at High Levels of Stimulation. *Opt Acta Int J Opt* **1**, 59–65.
- Ahnelt PK, Kolb H & Pflug R (1987). Identification of a subtype of cone photoreceptor, likely to be blue sensitive, in the human retina. *J Comp Neurol* **255**, 18–34.
- Ahuja P, Caffé AR, Holmqvist I, Söderpalm AK, Singh DP, Shinohara T & van Veen T (2001). Lens epithelium-derived growth factor (LEDGF) delays photoreceptor degeneration in explants of rd/rd mouse retina. *Neuroreport* **12**, 2951–2955.
- Akuffo KO, Nolan J, Stack J, Moran R, Feeney J, Kenny RA, Peto T, Dooley C, O’Halloran AM, Cronin H & Beatty S (2015). Prevalence of age-related macular degeneration in the Republic of Ireland. *Br J Ophthalmol* **99**, 1037–1044.
- Al-Zamil W & Yassin S (2017). Recent developments in age-related macular degeneration: a review. *Clin Interv Aging* **Volume 12**, 1313–1330.
- Allen AE, Martial FP & Lucas RJ (2019). Form vision from melanopsin in humans. *Nat Commun* **10**, 2274.
- Ambati J, Anand A, Fernandez S, Sakurai E, Lynn BC, Kuziel WA, Rollins BJ & Ambati BK

- (2003). An animal model of age-related macular degeneration in senescent Ccl-2- or Ccr-2-deficient mice. *Nat Med* **9**, 1390–1397.
- Ambati J, Atkinson JP & Gelfand BD (2013). Immunology of age-related macular degeneration. *Nat Rev Immunol* **13**, 438–451.
- Ambati J & Fowler BJ (2012). Mechanisms of Age-Related Macular Degeneration. *Neuron* **75**, 26–39.
- Applegate RA, Adams AJ, Cavender JC & Zisman F (1987). Early color vision changes in age-related maculopathy. *Appl Opt* **26**, 1458.
- Ardeljan D & Chan C-C (2013). Aging is not a disease: Distinguishing age-related macular degeneration from aging. *Prog Retin Eye Res* **37**, 68–89.
- Arden GB (2004). Colour vision testing as an aid to diagnosis and management of age related maculopathy. *Br J Ophthalmol* **88**, 1180–1185.
- AREDS A-REDSRG (2000). Risk factors associated with age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **107**, 2224–2232.
- AREDS A-REDSRG (2001). A Randomized, Placebo-Controlled, Clinical Trial of High-Dose Supplementation With Vitamins C and E, Beta Carotene, and Zinc for Age-Related Macular Degeneration and Vision Loss. *Arch Ophthalmol* **119**, 1417.
- Arevalo JF, Lasave AF, Arias J, Serrano M & Arevalo F (2013). Clinical applications of optical coherence tomography in the posterior pole: the 2011 José Manuel Espino Lecture - Part I. *Clin Ophthalmol* **7**, 2165.
- Arieta CEL, Nicolini Delgado AM, José NK, Temporini ER, Alves MR & de Carvalho Moreira Filho D (2003). Refractive errors and cataract as causes of visual impairment in Brazil. *Ophthalmic Epidemiol* **10**, 15–22.
- Askou AL, Alsing S, Holmgaard A, Bek T & Corydon TJ (2017). Dissecting microRNA dysregulation in age-related macular degeneration: new targets for eye gene therapy. *Acta Ophthalmol*; DOI: 10.1111/aos.13407.
- Barboni MTS, Pangeni G, Ventura DF, Horn F & Kremers J (2011). Heterochromatic Flicker

- Electroretinograms Reflecting Luminance and Cone Opponent Activity in Glaucoma Patients. *Investig Ophthalmology Vis Sci* **52**, 6757.
- Baumritter A, Clark CM, Martin R, Steinberg JD, Stoltz RA, Ying G-S, Brightwell-Arnold M & Maguire MG (2007). Prevalence of Age-Related Macular Degeneration Among Patients With Alzheimer's Disease. In *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, pp. 2092–2092. C.V. Mosby Co.
- Beach TG, Carew J, Serrano G, Adler CH, Shill HA, Sue LI, Sabbagh MN, Akiyama H & Cuenca N (2014). Phosphorylated α -synuclein-immunoreactive retinal neuronal elements in Parkinson's disease subjects. *Neurosci Lett* **571**, 34–38.
- Beatty S, Koh H-H, Phil M, Henson D & Boulton M (2000). The Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Age-Related Macular Degeneration. *Surv Ophthalmol* **45**, 115–134.
- Bellezza I (2018). Oxidative Stress in Age-Related Macular Degeneration: Nrf2 as Therapeutic Target. *Front Pharmacol* **9**, 1280.
- Bergamin O & Kardon RH (2003). Latency of the Pupil Light Reflex: Sample Rate, Stimulus Intensity, and Variation in Normal Subjects. *Investig Ophthalmology Vis Sci* **44**, 1546.
- Bergamin O, Schoetza A, Sugimoto K & Zulauf M (1998). The influence of iris color on the pupillary light reflex. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* **236**, 567.
- Besharse JC & Bok D (2011). *The retina and its disorders*. Academic Press.
- Bhutto I & Luty G (2012). Understanding age-related macular degeneration (AMD): Relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/Bruch's membrane/choriocapillaris complex. *Mol Aspects Med* **33**, 295–317.
- Binns A & Margrain TH (2006). Development of a technique for recording the focal rod ERG. *Ophthalmic Physiol Opt* **26**, 71–79.
- Bone RA & Landrum JT (2004). Heterochromatic flicker photometry. *Arch Biochem Biophys* **430**, 137–142.
- Bowes Rickman C, Farsiu S, Toth CA & Klingeborn M (2013). Dry Age-Related Macular Degeneration: Mechanisms, Therapeutic Targets, and Imaging. *Investig Ophthalmology Vis*

Sci **54**, ORSF68.

- Brown TM, Tsujimura S-I, Allen AE, Wynne J, Bedford R, Vickery G, Vugler A & Lucas RJ (2012). Melanopsin-Based Brightness Discrimination in Mice and Humans. *Curr Biol* **22**, 1134–1141.
- von der Burchard C, Treumer F, Ehlken C, Koinzer S, Purtskhvanidze K, Tode J & Roeder J (2018). Retinal volume change is a reliable OCT biomarker for disease activity in neovascular AMD. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* **256**, 1623–1629.
- Buschini E, Piras A, Nuzzi R & Vercelli A (2011). Age related macular degeneration and drusen: Neuroinflammation in the retina. *Prog Neurobiol* **95**, 14–25.
- Cachulo M da L, Laíns I, Lobo C, Figueira J, Ribeiro L, Marques JP, Costa J, Vieira A, Rodrigues J, Alves D, Nunes S, Costa M, Rodrigues V, Cunha-Vaz J, Delcourt C & Silva R (2016). Age-related macular degeneration in Portugal: prevalence and risk factors in a coastal and an inland town. The Coimbra Eye Study - Report 2. *Acta Ophthalmol* **94**, e442–e453.
- Campbell M & Humphries P (2012). The blood-retina barrier: tight junctions and barrier modulation. *Adv Exp Med Biol* **763**, 70–84.
- Campochiaro PA, Hackett SF, Vinore SA, Freund J, Csaky C, LaRochelle W, Henderer J, Johnson M, Rodriguez IR & Friedman Z (1994). Platelet-derived growth factor is an autocrine growth stimulator in retinal pigmented epithelial cells. *J Cell Sci* **107**, 2459 LP – 2469.
- Campochiaro PA, Sugg R, Grotendorst G & Hjelmeland LM (1989). Retinal pigment epithelial cells produce PDGF-like proteins and secrete them into their media. *Exp Eye Res* **49**, 217–227.
- Castelo-Branco M, Faria P, Forjaz V, Kozak LR & Azevedo H (2004). Simultaneous Comparison of Relative Damage to Chromatic Pathways in Ocular Hypertension and Glaucoma: Correlation with Clinical Measures. *Investig Ophthalmology Vis Sci* **45**, 499.
- Chakravarthy U, Wong TY, Fletcher A, Piau E, Evans C, Zlateva G, Buggage R, Pleil A & Mitchell P (2010). Clinical risk factors for age-related macular degeneration: a systematic

- review and meta-analysis. *BMC Ophthalmol* **10**, 31.
- Chandramohan A, Stinnett SS, Petrowski JT, Schuman SG, Toth CA, Cousins SW & Lad EM (2016). Visual Function Measures in Early and Intermediate Age-Related Macular Degeneration. *Retina* **36**, 1021–1031.
- Chang Y, Burns SA & Kreitz MR (1993). Red–green flicker photometry and nonlinearities in the flicker electroretinogram. *J Opt Soc Am A* **10**, 1413.
- Chen M, Forrester J V. & Xu H (2011). Dysregulation in Retinal Para-Inflammation and Age-Related Retinal Degeneration in CCL2 or CCR2 Deficient Mice ed. Klein R. *PLoS One* **6**, e22818.
- Cheung LK & Eaton A (2013). Age-Related Macular Degeneration. *Pharmacother J Hum Pharmacol Drug Ther* **33**, 838–855.
- Cholkar K, Dasari SR, Pal D & Mitra AK (2013). Eye: anatomy, physiology and barriers to drug delivery. In *Ocular Transporters and Receptors*, pp. 1–36. Elsevier.
- Chou R, Dana T, Bougatsos C, Grusing S & Blazina I (2016). Screening for Impaired Visual Acuity in Older Adults. *JAMA* **315**, 915.
- Coleman HR, Chan C-C, Ferris FL & Chew EY (2008). Age-related macular degeneration. *Lancet* **372**, 1835–1845.
- Colijn JM et al. (2017). Prevalence of Age-Related Macular Degeneration in Europe: The Past and the Future. *Ophthalmology* **124**, 1753–1763.
- Coscas G (2009). *Optical coherence tomography in age-related macular degeneration : OCT in AMD*. Springer Medizin.
- Costa M, Ventura D, Pavanello RCM, Cerqueira A & Zatz M (2004). Color vision phenotype in Duchenne Muscle Dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**, 424.
- Curcio CA (2001). Photoreceptor topography in ageing and age-related maculopathy. *Eye* **15**, 376–383.
- Curcio CA, Medeiros NE & Millican CL (1996). Photoreceptor loss in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **37**, 1236–1249.

- Dacey DM, Liao H-W, Peterson BB, Robinson FR, Smith VC, Pokorny J, Yau K-W & Gamlin PD (2005). Melanopsin-expressing ganglion cells in primate retina signal colour and irradiance and project to the LGN. *Nature* **433**, 749–754.
- Daluwatte C, Miles JH, Christ SE, Beversdorf DQ, Lofgreen A, Berliner N & Gang Yao (2012). Age-dependent pupillary light reflex parameters in children. In *2012 Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, pp. 3776–3779. IEEE.
- Delcourt C, Michel F, Colvez A, Lacroux A, Delage M & Vernet M-H (2001). Associations of cardiovascular disease and its risk factors with age-related macular degeneration: the POLA study. *Ophthalmic Epidemiol* **8**, 237–249.
- Ding X, Patel M & Chan C-C (2009). Molecular pathology of age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res* **28**, 1–18.
- Do MTH, Kang SH, Xue T, Zhong H, Liao H-W, Bergles DE & Yau K-W (2009). Photon capture and signalling by melanopsin retinal ganglion cells. *Nature* **457**, 281–287.
- Downie LE, Cheng AS & Vingrys AJ (2014). Color Vision Deficits in Intermediate Age-Related Macular Degeneration. *Optom Vis Sci* **91**, 932–938.
- Duque-Chica GL, Gracitelli CPB, Moura ALA, Nagy BV, Vidal KS, Paranhos A & Ventura DF (2018). Inner and Outer Retinal Contributions to Pupillary Light Response. *J Glaucoma* **27**, 1.
- Evans JR (2001). Risk Factors for Age-related Macular Degeneration. *Prog Retin Eye Res* **20**, 227–253.
- Eye Diseases Prevalence Research Group (2004). Prevalence of Age-Related Macular Degeneration in the United States. *Arch Ophthalmol* **122**, 564.
- Fan X, Hearne L, Lei B, Miles JH, Takahashi N & Yao G (2009). Weak gender effects on transient pupillary light reflex. *Auton Neurosci* **147**, 9–13.
- Farkas TG, Sylvester V, Archer D & Altona M (1971). The Histochemistry of Drusen. *Am J Ophthalmol* **71**, 1206–1215.

- Feeney-Burns L & Ellersieck MR (1985). Age-Related Changes in the Ultrastructure of Bruch's Membrane. *Am J Ophthalmol* **100**, 686–697.
- Feigl B, Brown B, Lovie-Kitchin J & Swann P (2005). Monitoring retinal function in early age-related maculopathy: visual performance after 1 year. *Eye* **19**, 1169–1177.
- Ferris FL, Wilkinson CP, Bird A, Chakravarthy U, Chew E, Csaky K & Sadda SR (2013). Clinical Classification of Age-related Macular Degeneration. *Ophthalmology* **120**, 844–851.
- Frennesson C, Nilsson UL & Nilsson SE (1995). Colour contrast sensitivity in patients with soft drusen, an early stage of ARM. *Doc Ophthalmol* **90**, 377–386.
- Friedman NJ, Kaiser PK & Trattler WB (2016). *Review of Ophthalmology: Expert Consult*, 3rd edn. Elsevier Health Sciences.
- Gamlin PDR, McDougal DH, Pokorny J, Smith VC, Yau K-W & Dacey DM (2007). Human and macaque pupil responses driven by melanopsin-containing retinal ganglion cells. *Vision Res* **47**, 946–954.
- Garcia-Layana A, Ciuffo G, Javier Zarranz-Ventura & Alvarez-Vidal A (2017). Optical Coherence Tomography in Age-related Macular Degeneration. Available at: <http://www.amdbook.org/content/optical-coherence-tomography-age-related-macular-degeneration> [Accessed May 2, 2018].
- Gass JD (1972). Drusen and disciform macular detachment and degeneration. *Trans Am Ophthalmol Soc* **70**, 409–436.
- Graham DM & Wong KY (2016). *Melanopsin-expressing, Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells (ipRGCs)*.
- Gualtieri M (2004). *Visão de cores e sensibilidade ao contraste em indivíduos com diabetes melito: avaliação psicofísica e eletrofisiológica* (thesis). Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Gualtieri M, Oliveira AGF, Canto-Pereira LHM, Costa MF, Salomão SR, Carelli V, Sadun AA, Quiros P & Ventura DF (2004). Sparing of the blue system in LHON (Leber's hereditary optic neuropathy). *Invest Ophthalmol Vis Sci*.

- Hageman GS, Luthert PJ, Chong NHV, Johnson L V., Anderson DH & Mullins RF (2001). An Integrated Hypothesis That Considers Drusen as Biomarkers of Immune-Mediated Processes at the RPE-Bruch's Membrane Interface in Aging and Age-Related Macular Degeneration. *Prog Retin Eye Res* **20**, 705–732.
- Hall CA & Chilcott RP (2018). Eyeing up the Future of the Pupillary Light Reflex in Neurodiagnostics. *Diagnostics* **8**, 19.
- He S & MacLeod DI. (2000). Spatial and temporal properties of light adaptation in the rod system. *Vision Res* **40**, 3073–3081.
- Ho AC & Regillo CD (2011). *Age-related Macular Degeneration Diagnosis and Treatment*, 1st edn.ed. Ho AC & Regillo CD. Springer New York, New York, NY.
- Holz FG, Gross-Jendroska M, Eckstein A, Hogg CR, Arden GB & Bird AC (1995). Colour contrast sensitivity in patients with age-related Bruch's membrane changes. *Ger J Ophthalmol* **4**, 336–341.
- Hood DC (2000). Assessing retinal function with the multifocal technique. *Prog Retin Eye Res* **19**, 607–646.
- Horie-Inoue K & Inoue S (2014). Genomic aspects of age-related macular degeneration. *Biochem Biophys Res Commun* **452**, 263–275.
- Hyman L (2000). Hypertension, Cardiovascular Disease, and Age-Related Macular Degeneration. *Arch Ophthalmol* **118**, 351.
- Imamoto Y & Shichida Y (2014). Cone visual pigments. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* **1837**, 664–673.
- Isaac DLC, Ávila MP de & Cialdini AP (2007). Comparison of the original Amsler grid with the preferential hyperacuity perimeter for detecting choroidal neovascularization in age-related macular degeneration. *Arq Bras Oftalmol* **70**, 771–776.
- Jackson GR, Clark ME, Scott IU, Walter LE, Quillen DA & Brigell MG (2014a). Twelve-Month Natural History of Dark Adaptation in Patients with AMD. *Optom Vis Sci* **91**, 925–931.

- Jackson GR, Scott IU, Kim IK, Quillen DA, Iannaccone A & Edwards JG (2014b). Diagnostic Sensitivity and Specificity of Dark Adaptometry for Detection of Age-Related Macular Degeneration. *Investig Ophthalmology Vis Sci* **55**, 1427.
- Jacob MM, Pangen G, Gomes BD, Souza GS, da Silva Filho M, Silveira LCL, Maguire J, Parry NRA, McKeefry DJ & Kremers J (2015). The Spatial Properties of L- and M-Cone Inputs to Electrophoretograms That Reflect Different Types of Post-Receptor Processing ed. Neuhauss SCF. *PLoS One* **10**, e0121218.
- Jager RD, Mieler WF & Miller JW (2008). Age-Related Macular Degeneration. *N Engl J Med* **358**, 2606–2617.
- Jarrett SG & Boulton ME (2012). Consequences of oxidative stress in age-related macular degeneration. *Mol Aspects Med* **33**, 399–417.
- Johnson L V, Ozaki S, Staples MK, Erickson PA & Anderson DH (2000). A Potential Role for Immune Complex Pathogenesis in Drusen Formation. *Exp Eye Res* **70**, 441–449.
- de Jong (2016). A Historical Analysis of the Quest for the Origins of Aging Macula Disorder, the Tissues Involved, and Its Terminology. *Ophthalmol Eye Dis* **8**, 5.
- De Jong PTVM (2018). Elusive drusen and changing terminology of AMD. *Eye* **32**, 904–914.
- Joyce DS, Feigl B, Kerr G, Roeder L & Zele AJ (2018). Melanopsin-mediated pupil function is impaired in Parkinson’s disease. *Sci Rep* **8**, 7796.
- Kauppinen A, Paterno JJ, Blasiak J, Salminen A & Kaarniranta K (2016). Inflammation and its role in age-related macular degeneration. *Cell Mol Life Sci* **73**, 1765–1786.
- Kendell KR, Quigley HA, Kerrigan LA, Pease ME & Quigley EN (1995). Primary open-angle glaucoma is not associated with photoreceptor loss. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **36**, 200–205.
- Kent DL (2014). Age-related macular degeneration: beyond anti-angiogenesis. *Mol Vis* **20**, 46–55.
- Khaliq A, Patel B, Jarvis-Evans J, Moriarty P, McLeod D & Boulton M (1995). Oxygen modulates production of bFGF and TGF-beta by retinal cells in vitro. *Exp Eye Res* **60**,

415–423.

Klein R, Klein BE., Tomany SC & Cruickshanks KJ (2003). The association of cardiovascular disease with the long-term incidence of age-related maculopathy. *Ophthalmology* **110**, 1273–1280.

Klein R, Meuer SM, Myers CE, Buitendijk GHS, Rochtchina E, Choudhury F, de Jong PTVM, McKean-Cowdin R, Iyengar SK, Gao X, Lee KE, Vingerling JR, Mitchell P, Klaver CCW, Wang JJ & Klein BEK (2014). Harmonizing the Classification of Age-related Macular Degeneration in the Three-Continent AMD Consortium. *Ophthalmic Epidemiol* **21**, 14–23.

Klein R, Wang Q, Klein BE, Moss SE & Meuer SM (1995). The relationship of age-related maculopathy, cataract, and glaucoma to visual acuity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **36**, 182–191.

Knoblauch K, Vital-Durand F & Barbur JL (2001). Variation of chromatic sensitivity across the life span. *Vision Res* **41**, 23–36.

Kolb H (2012). *Photoreceptors*. University of Utah Health Sciences Center.

Krebs C, Weinberg J & Akesson E (2013). *Neurociências ilustrada*, 2013th edn. Artmed, Porto Alegre.

Kremers J, Baraas RC & Marshall NJ (2016). *Human Color Visioned*. Kremers J, Baraas RC & Marshall NJ. Springer International Publishing, Cham.

Kremers J, Rodrigues AR, de Lima Silveira LC & da Silva Filho M (2010). Flicker ERGs Representing Chromaticity and Luminance Signals. *Investig Ophthalmology Vis Sci* **51**, 577.

Lambert NG, ElShelmani H, Singh MK, Mansergh FC, Wride MA, Padilla M, Keegan D, Hogg RE & Ambati BK (2016). Risk factors and biomarkers of age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res* **54**, 64–102.

Lazzerini Osprei L, Prusky G & Hattar S (2017). Mood, the Circadian System, and Melanopsin Retinal Ganglion Cells. *Annu Rev Neurosci* **40**, 539–556.

- Lee BB (2011). Visual pathways and psychophysical channels in the primate. *J Physiol* **589**, 41–47.
- Liao H-W, Ren X, Peterson BB, Marshak DW, Yau K-W, Gamlin PD & Dacey DM (2016). Melanopsin-expressing ganglion cells on macaque and human retinas form two morphologically distinct populations. *J Comp Neurol* **524**, 2845–2872.
- Likhar N, Mothe RK, Kanukula R, Shah C & Dang A (2015). The prevalence of age-related Macular degeneration in Indian Population: a systematic review. *Value Heal* **18**, A180.
- Lim J (2007). *Age-Related Macular Degeneration, Second Edition*, 2nd edn.ed. Lim J. CRC Press, New York.
- Lim LS, Mitchell P, Seddon JM, Holz FG & Wong TY (2012). Age-related macular degeneration. *Lancet* **379**, 1728–1738.
- Lima VC, Rosen RB & Farah M (2016). Macular pigment in retinal health and disease. *Int J Retin Vitr* **2**, 19.
- Lin M-S, Liao P-Y, Chen H-M, Chang C-P, Chen S-K & Chern Y (2019). Degeneration of ipRGCs in Mouse Models of Huntington’s Disease Disrupts Non-Image-Forming Behaviors Before Motor Impairment. *J Neurosci* **39**, 1505–1524.
- Liu L, Wang Y-Z & Bedell HE (2014). Visual-Function Tests for Self-monitoring of Age-Related Macular Degeneration. *Optom Vis Sci* **91**, 956–965.
- Loewenstein A, Malach R, Goldstein M, Leibovitch I, Barak A, Baruch E, Alster Y, Rafaeli O, Avni I & Yassur Y (2003). Replacing the Amsler grid. *Ophthalmology* **110**, 966–970.
- van Lookeren Campagne M, LeCouter J, Yaspan BL & Ye W (2014). Mechanisms of age-related macular degeneration and therapeutic opportunities. *J Pathol* **232**, 151–164.
- van Lookeren Campagne M, Strauss EC & Yaspan BL (2016). Age-related macular degeneration: Complement in action. *Immunobiology* **221**, 733–739.
- Markwell EL, Feigl B & Zele AJ (2010). Intrinsically photosensitive melanopsin retinal ganglion cell contributions to the pupillary light reflex and circadian rhythm. *Clin Exp Optom* **93**, 137–149.

- Martins CMG (2018). *Avaliação das vias do sistema visual por eletrorretinograma e testes psicofísicos na Distrofia Muscular de Duchenne e na Diabetes Mellitus tipo 1* (thesis). Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Martins CMG, Tsai T, Barboni MTS, da Costa MF, Nagy B, Ventura DF & Kremers J (2016). The influence of stimulus size on heterochromatic modulation electroretinograms. *J Vis* **16**, 13.
- Maynard ML, Zele AJ & Feigl B (2015). Melanopsin-mediated post-illumination pupil response in early age-related macular degeneration. *Investig Ophthalmol Vis Sci* **56**, 6906–6913.
- McDougal DH & Gamlin PD (2010). The influence of intrinsically-photosensitive retinal ganglion cells on the spectral sensitivity and response dynamics of the human pupillary light reflex. *Vision Res* **50**, 72–87.
- Medeiros FA, Zangwill LM, Anderson DR, Liebmann JM, Girkin CA, Harwerth RS, Fredette M-J & Weinreb RN (2012). Estimating the Rate of Retinal Ganglion Cell Loss in Glaucoma. *Am J Ophthalmol* **154**, 814-824.e1.
- Mehta S (2015). Age-Related Macular Degeneration. *Prim Care Clin Off Pract* **42**, 377–391.
- Midena E, Degli Angeli C, Blarzino MC, Valenti M & Segato T (1997). Macular function impairment in eyes with early age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **38**, 469–477.
- Mitchell P, Liew G, Gopinath B & Wong TY (2018). Age-related macular degeneration. *Lancet* **392**, 1147–1159.
- Mollon JD & Reffin JP (1989). A computer-controlled color-vision test that combines the principles of Chibret and of Stilling. In *Journal of Physiology-London*, pp. P5–P5. CAMBRIDGE UNIV PRESS 40 WEST 20TH STREET, NEW YORK, NY 10011-4211.
- La Morgia C et al. (2016). Melanopsin retinal ganglion cell loss in Alzheimer disease. *Ann Neurol* **79**, 90–109.
- La Morgia C, Ross-Cisneros FN, Sadun AA & Carelli V (2017). Retinal Ganglion Cells and Circadian Rhythms in Alzheimer’s Disease, Parkinson’s Disease, and Beyond. *Front*

Neurol **8**, 162.

- La Morgia C, Ross-Cisneros FN, Sadun AA, Hannibal J, Munarini A, Mantovani V, Barboni P, Cantalupo G, Tozer KR, Sancisi E, Salomao SR, Moraes MN, Moraes-Filho MN, Heegaard S, Milea D, Kjer P, Montagna P & Carelli V (2010). Melanopsin retinal ganglion cells are resistant to neurodegeneration in mitochondrial optic neuropathies. *Brain* **133**, 2426–2438.
- Moura ALA, Nagy B V, La Morgia C, Barboni P, Oliveira AGF, Salomão SR, Berezovsky A, de Moraes-Filho MN, Chicani CF, Belfort R, Carelli V, Sadun AA, Hood DC, Ventura DF & Ventura DF (2013). The pupil light reflex in Leber's hereditary optic neuropathy: evidence for preservation of melanopsin-expressing retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **54**, 4471–4477.
- Neitz J & Neitz M (2011). The genetics of normal and defective color vision. *Vision Res* **51**, 633–651.
- Nicolas CM, Robman LD, Tikellis G, Dimitrov PN, Dowrick A, Guymer RH & McCarty CA (2003). Iris colour, ethnic origin and progression of age-related macular degeneration. *Clin Exp Ophthalmol* **31**, 465–469.
- Oguido APMT, Casella AMB, Matsuo T, Ramos Filho EH de F, Berbel R & Silva RMA (2008). Prevalence of age-related macular degeneration in Japanese immigrants and their descendants living in Londrina (PR) - Brazil. *Arq Bras Oftalmol* **71**, 375–380.
- Owsley C, McGwin G, Jackson GR, Kallies K & Clark M (2007). Cone- and Rod-Mediated Dark Adaptation Impairment in Age-Related Maculopathy. *Ophthalmology* **114**, 1728–1735.
- Paramei G V. (2012). Color discrimination across four life decades assessed by the Cambridge Colour Test. *J Opt Soc Am A* **29**, A290.
- Park JC & McAnany JJ (2015). Effect of stimulus size and luminance on the rod-, cone-, and melanopsin-mediated pupillary light reflex. *J Vis* **15**, 13.
- Park JC, Moura AL, Raza AS, Rhee DW, Kardon RH & Hood DC (2011). Toward a clinical protocol for assessing rod, cone, and melanopsin contributions to the human pupil

- response. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **52**, 6624–6635.
- Paul KN, Saafir TB & Tosini G (2009). The role of retinal photoreceptors in the regulation of circadian rhythms. *Rev Endocr Metab Disord* **10**, 271–278.
- Pickard GE & Sollars PJ (2011). Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells. In *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 162, pp. 59–90. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Pinckers A (1980). Color Vision and Age. *Ophthalmologica* **181**, 23–30.
- Del Priore L V, Kuo Y-H & Tezel TH (2002). Age-Related Changes in Human RPE Cell Density and Apoptosis Proportion In Situ. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**, 3312–3318.
- Provencio I, Rodriguez IR, Jiang G, Hayes WP, Moreira EF & Rollag MD (2000). A novel human opsin in the inner retina. *J Neurosci* **20**, 600–605.
- Raman R, Pal SS, Ganesan S, Gella L, Vaitheeswaran K & Sharma T (2016). The prevalence and risk factors for age-related macular degeneration in rural–urban India, Sankara Nethralaya Rural–Urban Age-related Macular degeneration study, Report No. 1. *Eye* **30**, 688–697.
- Ratnapriya R & Chew EY (2013). Age-related macular degeneration-clinical review and genetics update. *Clin Genet* **84**, 160–166.
- Rattner A & Nathans J (2006). Macular degeneration: recent advances and therapeutic opportunities. *Nat Rev Neurosci* **7**, 860–872.
- Regan B., Freudenthaler N, Kolle R, Mollon J. & Paulus W (1998). Colour discrimination thresholds in Parkinson’s disease: results obtained with a rapid computer-controlled colour vision test. *Vision Res* **38**, 3427–3431.
- Regan BC, Reffin JP & Mollon JD (1994). Luminance noise and the rapid determination of discrimination ellipses in colour deficiency. *Vision Res* **34**, 1279–1299.
- Ribeiro MJ & Castelo-Branco M (2010). Psychophysical channels and ERP population responses in human visual cortex: Area summation across chromatic and achromatic pathways. *Vision Res* **50**, 1283–1291.

- Rudolf M, Clark ME, Chimento MF, Li C-M, Medeiros NE & Curcio CA (2008). Prevalence and Morphology of Druse Types in the Macula and Periphery of Eyes with Age-Related Maculopathy. *Investig Ophthalmology Vis Sci* **49**, 1200.
- Rukmini A V., Milea D & Gooley JJ (2019). Chromatic Pupillometry Methods for Assessing Photoreceptor Health in Retinal and Optic Nerve Diseases. *Front Neurol* **10**, 76.
- Salomão SR, Cinoto RW, Berezovsky A, Araújo-Filho A, Mitsuhiro MRKH, Mendieta L, Morales PHA, Pokharel GP, Belfort R & Ellwein LB (2008). Prevalence and Causes of Vision Impairment and Blindness in Older Adults in Brazil: The São Paulo Eye Study. *Ophthalmic Epidemiol* **15**, 167–175.
- Santos LPF, Diniz JR, Leão AC de S & Sena MF de (2005). Degeneração macular relacionada à idade: prevalência e fatores de risco em dois centros oftalmológicos de referência em Pernambuco. *Arq Bras Oftalmol* **68**, 229–233.
- Schmidt TM, Chen S-K & Hattar S (2011a). Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells: many subtypes, diverse functions. *Trends Neurosci* **34**, 572–580.
- Schmidt TM, Do MTH, Dacey D, Lucas R, Hattar S & Matynia A (2011b). Melanopsin-Positive Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells: From Form to Function. *J Neurosci* **31**, 16094 LP – 16101.
- Schmidt TM & Kofuji P (2009). Functional and Morphological Differences among Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells. *J Neurosci* **29**, 476–482.
- Seddon JM (2003). Progression of Age-Related Macular Degeneration. *Arch Ophthalmol* **121**, 785.
- Seiple WH, Siegel IM, Carr RE & Mayron C (1986). Evaluating macular function using the focal ERG. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **27**, 1123–1130.
- Sexton T, Buhr E & Van Gelder RN (2012). Melanopsin and Mechanisms of Non-visual Ocular Photoreception. *J Biol Chem* **287**, 1649–1656.
- Shelley EJ (2009). Cone Degeneration in Aging and Age-Related Macular Degeneration. *Arch Ophthalmol* **127**, 483.

Siegel A & Sapru HN (2006). *Essential Neuroscience*.

Silverthorn DU (2016). *Fisiologia Humana: Uma Abordagem Integrada*, 1st edn. Artmed, Porto Alegre.

Simunovic M., Votruba M, Regan B. & Mollon J. (1998). Colour discrimination ellipses in patients with dominant optic atrophy. *Vision Res* **38**, 3413–3419.

Simunovic MP (2016). Acquired color vision deficiency. *Surv Ophthalmol* **61**, 132–155.

Slomiany MG & Rosenzweig SA (2004). Autocrine effects of IGF-I-induced VEGF and IGFBP-3 secretion in retinal pigment epithelial cell line ARPE-19. *Am J Physiol Physiol* **287**, C746–C753.

Slooter J & van Norren D (1980). Visual acuity measured with pupil responses to checkerboard stimuli. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **19**, 105–108.

Smith W, Assink J, Klein R, Mitchell P, Klaver CC., Klein BE., Hofman A, Jensen S, Wang JJ & de Jong PTV. (2001). Risk factors for age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **108**, 697–704.

Snodderly DM, Mares JA, Wooten BR, Oxtan L, Gruber M & Ficek T (2004). Macular Pigment Measurement by Heterochromatic Flicker Photometry in Older Subjects: The Carotenoids and Age-Related Eye Disease Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**, 531–538.

Soubrane G (2009). *Degeneração Macular Relacionado à Idade*, 1st edn.ed. Machado AJ, Noia L & Neto MP. Guanabara Koogan.

Spitschan M, Bock AS, Ryan J, Frazzetta G, Brainard DH & Aguirre GK (2017). The human visual cortex response to melanopsin-directed stimulation is accompanied by a distinct perceptual experience. *Proc Natl Acad Sci* **114**, 12291–12296.

Straub RH, Thies U & Kerp L (1992). The Pupillary Light Reflex. *Ophthalmologica* **204**, 134–142.

Streilein JW, Ma N, Wenkel H, Fong Ng T & Zamiri P (2002). Immunobiology and privilege of neuronal retina and pigment epithelium transplants. *Vision Res* **42**, 487–495.

Tomany SC, Klein R & Klein BE. (2003). The relationship between iris color, hair color, and

- skin sun sensitivity and the 10-year incidence of age-related maculopathy. *Ophthalmology* **110**, 1526–1533.
- Tripathy K & Joe S (2019). *Amsler Grid*.
- Tuo J, Bojanowski CM & Chan C-C (2004). Genetic factors of age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res* **23**, 229–249.
- Urosevich TG & Capo-Aponte J e (2013). Pupillary Light Reflex as an Objective Biomarker for Early Identification of Blast-Induced mTBI. *J Spine* **2**, 1–5.
- Vemala R, Sivaprasad S & Barbur JL (2017). Detection of Early Loss of Color Vision in Age-Related Macular Degeneration – With Emphasis on Drusen and Reticular Pseudodrusen. *Investig Ophthalmology Vis Sci* **58**, BIO247.
- Ventura DF, Costa MF, Gualtieri M, Nishi M, Bernick M, Bonci D & De Souza JM (2003). Early Vision Loss in Diabetic Patients Assessed by the Cambridge Colour Test. In *Normal and Defective Colour Vision*, pp. 395–403. Oxford University Press.
- Ventura DF, Gualtieri M, Oliveira AGF, Costa MF, Quiros P, Sadun F, de Negri AM, Salomão SR, Berezovsky A, Sherman J, Sadun AA & Carelli V (2007). Male Prevalence of Acquired Color Vision Defects in Asymptomatic Carriers of Leber’s Hereditary Optic Neuropathy. *Investig Ophthalmology Vis Sci* **48**, 2362.
- Ventura DF, Simões AL, Tomaz S, Costa MF, Lago M, Costa MTV, Canto-Pereira LHM, de Souza JM, Faria MAM & Silveira LCL (2005). Colour vision and contrast sensitivity losses of mercury intoxicated industry workers in Brazil. *Environ Toxicol Pharmacol* **19**, 523–529.
- Wada M, Gelfman CM, Matsunaga H, Alizadeh M, Morse L, Handa JT & Hjelmeland LM (2001). Density-dependent expression of FGF-2 in response to oxidative stress in RPE cells in vitro. *Curr Eye Res* **23**, 226–231.
- Walsh N, Valter K & Stone J (2001). Cellular and Subcellular Patterns of Expression of bFGF and CNTF in the Normal and Light Stressed Adult Rat Retina. *Exp Eye Res* **72**, 495–501.
- Wang JCC, Cao S, Wang A, To E, Law G, Gao J, Zhang D, Cui JZ & Matsubara JA (2015). CFH Y402H polymorphism is associated with elevated vitreal GM-CSF and choroidal

- macrophages in the postmortem human eye. *Mol Vis* **21**, 264–272.
- Wang Y, Zekveld AA, Naylor G, Ohlenforst B, Jansma EP, Lorens A, Lunner T & Kramer SE (2016). Parasympathetic Nervous System Dysfunction, as Identified by Pupil Light Reflex, and Its Possible Connection to Hearing Impairment ed. Kapoula Z. *PLoS One* **11**, e0153566.
- Wenkel H & Streilein JW (2000). Evidence that Retinal Pigment Epithelium Functions as an Immune-Privileged Tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**, 3467–3473.
- Werner A, Bayer A, Schwarz G, Zrenner E & Paulus W (2010). Effects of ageing on postreceptoral short-wavelength gain control: Transient tritanopia increases with age. *Vision Res* **50**, 1641–1648.
- Wilde C, Poostchi A, Mehta RL, MacNab HK, Hillman JG, Vernon SA & Amoaku WM (2017). Prevalence of age-related macular degeneration in an elderly UK Caucasian population—The Bridlington Eye Assessment Project: a cross-sectional study. *Eye* **31**, 1042–1050.
- Wilhelm H (2011). Disorders of the pupil. *Handb Clin Neurol* **102**, 427–466.
- Williams MA, Craig D, Passmore P & Silvestri G (2009). Retinal drusen: harbingers of age, safe havens for trouble. *Age Ageing* **38**, 648–654.
- Wong KY (2009). Non-Photoreceptor Photoreception. In *Encyclopedia of Neuroscience*, pp. 1205–1211. Elsevier.
- Wong WL, Su X, Li X, Cheung CMG, Klein R, Cheng C-Y & Wong TY (2014). Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Heal* **2**, e106–e116.
- Xiang P, Wu KC, Zhu Y, Xiang L, Li C, Chen DL, Chen F, Xu G, Wang A, Li M & Jin ZB (2014). A novel Bruch’s membrane-mimetic electrospun substrate scaffold for human retinal pigment epithelium cells. *Biomaterials* **35**, 9777–9788.
- Zaffer A, Chawla J, Park Y, Jost M, Singh J, Gorbien M & Gaynes B (2015). Demonstration of Abnormality of Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells (ipRGCs) in Patients with Parkinson’s Disease. (P6.064). *Neurology* **84**, P6.064.

- Zarbin MA (2004). Current Concepts in the Pathogenesis of Age-Related Macular Degeneration. *Arch Ophthalmol* **122**, 598.
- Zeile AJ, Adhikari P, Feigl B & Cao D (2018a). Cone and melanopsin contributions to human brightness estimation. *J Opt Soc Am A* **35**, B19.
- Zeile AJ, Feigl B, Adhikari P, Maynard ML & Cao D (2018b). Melanopsin photoreception contributes to human visual detection, temporal and colour processing. *Sci Rep* **8**, 3842.
- Zhang Q, Lu R, Wang B, Messinger JD, Curcio CA & Yao X (2015). Functional Optical Coherence Tomography Enables In Vivo Physiological Assessment of Retinal Rod and Cone Photoreceptors. *Sci Rep* **5**, 9595.

7. Apêndices

Apêndice A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Instituto de Psicologia

Avaliação das Funções Visuais e Cognitivas de Pacientes portadores de Degeneração Macular Relacionada à Idade

Você está sendo convidado a participar da pesquisa “Avaliação das Funções Visuais e Cognitivas de Pacientes portadores de Degeneração Macular Relacionada à Idade”, que tem como objetivo examinar as possíveis alterações da visão e das funções cognitivas que podem ocorrer na Degeneração Macular Relacionada à Idade.

Após a sua avaliação oftalmológica de rotina no Núcleo de Oftalmologia da Prevent Senior que consiste no exame oftalmológico completo incluindo: acuidade visual, biomicroscopia anterior, mapeamento de retina, OCT (Tomografia de Coerência Óptica) e demais exames que seu oftalmologista julgar necessário, caso deseje participar e se enquadre nos critérios de inclusão do estudo, você será encaminhado ao Laboratório de Eletrofisiologia e Psicofísica Visual do IPUSP e, posteriormente, serão realizados os seguintes testes:

Inventário de depressão (Inventário Beck de Depressão): é composto por afirmações às quais o participante deverá atribuir uma “nota” de acordo com a adequação do conteúdo da frase com seu momento de vida atual;

Bateria de exames neuropsicológicos (CANTABeclipse): inclui testes computadorizados de atenção, memória, linguagem, funções viso-espaciais, raciocínio abstrato e funções intelectuais gerais. Serão apresentadas algumas tarefas no monitor e o participante deverá executá-las de acordo com as orientações do pesquisador;

Teste de visão de cores (CCT): avalia a capacidade de discriminação de cores. Estímulos são apresentados em um monitor e o participante tem a função de identificar a posição desses estímulos;

Pupilometria: tem como objetivo avaliar a resposta pupilar à luz. Serão apresentados flashes de luz vermelha e azul de diferentes intensidades. Uma câmera irá filmar os movimentos da pupila em resposta à apresentação dos estímulos;

Eletrofisiologia visual: no exame de eletrorretinograma um colírio será pingado para dilatação da pupila. Durante o exame, o participante fica sentado em frente a uma cúpula onde aparecerão luzes piscando para estimular a retina e verificar seu funcionamento. As respostas serão captadas por um eletrodo colocado na parte

inferior do olho. Para evitar desconforto durante o exame, será feita anestesia prévia da córnea com uso de colírio anestésico. O eletrodo será descartado após utilização.

Os exames não são invasivos, no entanto, para a realização dos exames de eletrorretinograma no Laboratório de Eletrofisiologia e Psicofísica Visual do IPUS, e mapeamento de retina e OCT no Núcleo de Oftalmologia da Prevent Senior, será necessário a dilatação da pupila utilizando colírio midriático tópico (tropicamida 1%).

Após a dilatação, é comum a visão ficar embaçada e ocorrer sensibilidade à luz durante 4 a 6 horas após a dilatação. Em caso raros, após a dilatação pupilar, pode haver risco de glaucoma agudo de ângulo fechado em pacientes que apresentem uma condição anatômica conhecida como câmara rasa. No entanto, durante sua avaliação oftalmológica no Núcleo de Oftalmologia da Prevent Senior, esta contraindicação para dilatação pupilar será pesquisada, pois a dilatação pupilar se faz necessária para realização de exames oftalmológicos como mapeamento de retina e OCT que auxiliarão no diagnóstico e tratamento do seu quadro clínico, e que serão indicados pelo seu oftalmologista independente da sua participação nesta pesquisa, pois fazem parte da rotina oftalmológica do Núcleo de Oftalmologia da Prevent Senior.

Durante o exame de pupilometria, é normal sentir um desconforto causado pelo estímulo luminoso. O incômodo desaparecerá alguns minutos após o final do exame.

Aos participantes não serão oferecidos benefícios financeiros por sua participação no estudo. No entanto, sua participação no estudo nos ajudará compreender os mecanismos de doenças que afetam a retina e as formas de minimizar seus prejuízos, como a cegueira. Além disso, caso seja detectada qualquer alteração grave nos exames realizados Laboratório de Eletrofisiologia e Psicofísica Visual do IPUSP, será fornecido relatório detalhado que será encaminhado ao seu oftalmologista no do Núcleo de Oftalmologia da Prevent Senior. Reforçamos que você receberá o mesmo acompanhamento e tratamento oftalmológico no Núcleo de Oftalmologia da Prevent Senior independente de aceitar a participar da pesquisa ou não.

Caso aceite participar da pesquisa, há uma possibilidade de você ser convocado novamente após 2 anos para repetir os testes no realizados Laboratório de Eletrofisiologia e Psicofísica Visual do IPUSP.

Os resultados serão sigilosos e o nome do participante não será divulgado. Apenas os dados dos resultados da avaliação poderão ser divulgados em publicações científicas.

Como participante desta pesquisa:

- Você está livre para esclarecer quaisquer dúvidas sobre este estudo antes, durante e depois do curso da pesquisa;
- Sua participação é voluntária e você tem liberdade de se recusar a participar ou retirar seu consentimento a qualquer momento e sem qualquer penalização ou prejuízo;
- Você poderá ter conhecimento dos dados obtidos mediante relatório;

- Caso seja detectada qualquer alteração grave, será fornecida orientação quanto à necessidade de encaminhamento.

“Após leitura das informações acima, declaro estar consciente da utilidade do presente estudo e autorizo a utilização dos resultados dos exames para análise de dados e publicações científicas”.

Assinatura do Pesquisador

Assinatura do Participante

Identificação do participante:

Nome:

R.G.:

Data de nascimento:

Endereço:

Cidade:

Estado:

Telefones:

São Paulo, _____ de _____ de 2019.

Este termo de consentimento dispõe de duas vias, sendo uma de posse do participante e outra do pesquisador.

*Pesquisador: Kallene Summer Moreira Vidal, Diego Decleva, Paulo Augusto Hidalgo de Menezes e Dora Fix Ventura

Endereço: Instituto de Psicologia da USP - Av. Professor Mello Moraes, 1721 – Bloco B

Cidade Universitária, SP, São Paulo. CEP: 05508-030.

Telefone para contato: (11) 30914263.

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CPH-IPUSP)

Endereço: Av. Professor Mello Moraes, 1721 – Bloco G, 2º andar, sala 27
CEP 05508-030 - Cidade Universitária - São Paulo/SP

E-mail: ceph.ip@usp.br - Telefone: (11) 3091-4182

Apêndice B – Parecer do Comitê de ética

USP- INSTITUTO DE
PSICOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Avaliação das Funções Visuais e Cognitivas de Pacientes portadores de Degeneração Macular Relacionada à Idade

Pesquisador: Kallene Summer Moreira Vidal

Área Temática:

Versão: 5

CAAE: 56608616.1.0000.5561

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

Patrocinador Principal: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.065.527

Apresentação do Projeto:

A degeneração macular relacionada à idade (DMRI) é a causa mais comum de deficiência visual e cegueira em pacientes com idade a partir de 65 anos (Congdon et al., 2004), sendo que a prevalência de cegueira é de 8,7% entre os indivíduos acometidos pela doença (OMS, 2015).

Trata-se de uma doença degenerativa, progressiva, de acometimento tardio, relacionada a alterações na estrutura da retina.

Ainda pouco se sabe a respeito do efeito da DMRI na visão de cores, na funcionalidade das células ganglionares que contém melanopsina (ipRGCs) e na eletrofisiologia visual. Além disso, há indícios de que a DMRI possa estar associada a perdas cognitivas.

O presente estudo tem como objetivo avaliar a visão de cores, o reflexo pupilar à luz (conduzido, entre outros, pelas ipRGCs) e a eletrofisiologia visual em pacientes com DMRI, em diferentes estágios da doença, e compará-los a indivíduos saudáveis, além de avaliar as funções cognitivas de pacientes com DMRI, em diferentes estágios da doença, e compará-los a indivíduos saudáveis.

Objetivo da Pesquisa:

- Avaliar a função visual através de métodos psicofísicos, reflexo pupilar à luz e eletrofisiologia em pacientes com diferentes estágios da DMRI e alterações suspeitas da mácula, e compará-los a

Endereço: Av. Prof. Mello Moraes, 1721 - Bl. "G" sala 27

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-030

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-4182

E-mail: ceph.ip@usp.br

USP- INSTITUTO DE
PSICOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 2.065.527

indivíduos saudáveis; e pacientes com Alzheimer e comprometimento cognitivo leve (CCL).

- Avaliar as funções cognitivas de pacientes com DMRI, em diferentes estágios da doença, e compará-los a indivíduos saudáveis;
- Observar se as alterações das funções visuais encontradas na avaliação inicial de pacientes portadores de DMRI progridem após 2 anos de evolução nos diferentes grupos testados.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme a pesquisadora,

"Riscos:

O presente estudo não apresenta quaisquer riscos para os participantes.

Benefícios:

Não haverá benefícios pessoais para os participantes. O único benefício é o de ser sujeito ativo no processo de construção de conhecimento. O benefício geral do estudo é a ampliação do conhecimento acerca da DMRI e sua possível relação com a Doença de Alzheimer."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Número de participantes: 120

Grupos em que serão divididos os participantes da pesquisa neste centro

Controle 20

Alterações maculares suspeitas 20

DMRI não exsudativa inicial 20

DMRI exsudativa não tratada e após tratamento 20

Alzheimer 20

CCL 20

Justificativa da Emenda:

Eu, Kallene Summer Moreira Vidal, pesquisadora responsável pelo projeto de pesquisa intitulado "Avaliação das funções visuais e cognitivas de pacientes portadores de degeneração macular relacionada à idade", venho por meio desta solicitar a substituição da pesquisadora Ana Luisa Vidal Milioni, pelo pesquisador Diego Vinicius Lopes Decleva. Desta forma, a pesquisadora Ana Luisa Vidal Milioni deixa de fazer parte da equipe de pesquisa do projeto supracitado tendo a continuidade de suas atividades como responsabilidade do novo pesquisador.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todas as alterações solicitadas foram realizadas pela pesquisadora. As alterações estão destacadas

Endereço: Av. Prof. Mello Moraes, 1721 - Bl. "G" sala 27

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-030

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-4182

E-mail: ceph.ip@usp.br

Página 02 de 04

USP- INSTITUTO DE
PSICOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 2.065.527

em vermelho no documento intitulado tcle_plataforma_brasil_set2016.docx.

Recomendações:

Não há recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto está aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Se o projeto prevê aplicação de TCLE, todas as páginas do documento deverão ser rubricadas pelo pesquisador e pelo voluntário e a última página assinada por ambos, conforme Carta Circular no 003/2011 da CONEP/CNS.

Salientamos que o pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEPH de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Lembramos que esta modificação necessitará de aprovação ética do CEPH antes de ser implementada. De acordo com a Res. CNS 466/12, o pesquisador deve apresentar a este CEP/SMS o relatório final do projeto desenvolvido, conforme preenchimento de Protocolo disponível na página do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do IPUSP, do site do IPUSP. Em seguida, o protocolo preenchido deverá ser enviado ao CEPH pela Plataforma Brasil, ícone Notificação, logo que o mesmo estiver concluído.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_904949 E2.pdf	18/04/2017 12:55:40		Aceito
Outros	carta_ceph_setembro.docx	26/09/2016 08:51:19	Kallene Summer Moreira Vidal	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle_plataforma_brasil_set2016.docx	26/09/2016 08:50:27	Kallene Summer Moreira Vidal	Aceito
Outros	carta_ceph.docx	29/06/2016 12:30:29	Kallene Summer Moreira Vidal	Aceito
Folha de Rosto	diretoria.pdf	31/05/2016 16:59:44	Kallene Summer Moreira Vidal	Aceito
Projeto Detalhado	DMRI_projetoCEP.docx	23/05/2016	Kallene Summer	Aceito

Endereço: Av. Prof. Mello Moraes, 1721 - Bl. "G" sala 27

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-030

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-4182

E-mail: ceph.ip@usp.br

Página 03 de 04