

Universidade de São Paulo
Instituto de Psicologia

LEONARDO APARECIDO SILVA

Impacto de diferentes tipos de alteração do gene da
distrofina na visão de pacientes com distrofia muscular

São Paulo
2019

LEONARDO APARECIDO SILVA

Impacto de diferentes tipos de alteração do gene da
distrofina na visão de pacientes com distrofia muscular
(versão corrigida)

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

Área de Concentração:
Neurociências e Comportamento

Orientadora: Profa. Dra. Dora Fix Ventura

Coorientadora: Dra. Mirella Telles Salgueiro Barboni

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.

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

Silva, Leonardo Aparecido.

Impacto de diferentes tipos de alteração do gene da distrofina na visão de pacientes com distrofia muscular / Leonardo Aparecido Silva; orientador Dora Fix Ventura Fix Ventura; coorientador Mirella Telles Salgueiro Barboni. -- São Paulo, 2019.

89 f.

Dissertação -- Área de Concentração: Neurociências e Comportamento – Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

1. Visão humana. 2. Psicofísica. 3. Distrofina. 4. Distrofia muscular de Duchenne . 5. Distrofia muscular de Becker.I. Título.

Nome: Silva, L. A.

Título: Impacto de diferentes tipos de alteração do gene da distrofina na visão de pacientes com distrofia muscular

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

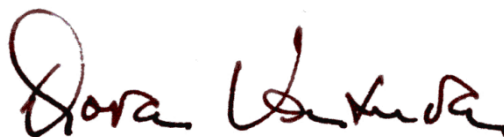
Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). Dora Fix Ventura

Instituição: Universidade de São Paulo

Assinatura:



Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Agradecimentos

À Professora Dora Fix Ventura pela orientação, dedicação e entusiasmo. Pela oportunidade, liberdade e confiança depositadas. Por ser um exemplo de pessoa e profissional.

À Doutora Mirella Telles Salgueiro Barboni pela coorientação, ajuda e suporte no desenvolvimento da pesquisa. Por toda colaboração desde o início do projeto.

Ao Doutor Luis Fernando Grossklauss por fornecer os resultados dos exames de DNA dos pacientes atendidos no setor de doenças neuromusculares da Universidade Federal de São Paulo e abrir as portas para realizar os testes no local que são atendidos os pacientes.

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

Ao Doutor Francisco Max Damico pelo carinho e atenção na avaliação de controles e pacientes.

À Doutora Kallene Summer Moreira Vidal por toda ajuda nas avaliações de controles e pacientes.

À minha família pelo apoio, ajuda e respeito para buscar meus objetivos longe de casa. Sou profundamente grato pelo esforço de cada um. Obrigado, aos meus pais, Ademir e Diva, ao meu irmão, Leandro, minha cunhada e sobrinha, Franciele e Samanta, a minha avó materna e tia, Josefina (Titia) e Dirce, e minha avó paterna, Euvira. Amo vocês.

À Heyne Midori por todo companheirismo e por todo o amor dedicado.

À Thárcila Alves e Sarah Dias que participaram diretamente na realização da pesquisa com dedicação e ajuda.

Aos colegas do Labvis que sempre colaboraram com sugestões e críticas para melhorar a pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de mestrado e suportes financeiros. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelos suportes financeiros.

A todos os participantes dessa pesquisa que voluntariamente dedicaram um tempo para a realização dos exames.

Apoio Financeiro

Bolsa de Mestrado FAPESP (2017/16948-4)

Projeto Regular FAPESP (2016/04538-3)

Projeto Temático FAPESP (2014/26818-2)

Programa Pró-Amazônia CAPES (3263/2013)

RESUMO

INTRODUÇÃO: Distrofia muscular de Duchenne (DMD) e distrofia muscular de Becker (BMD) são distúrbios neuromusculares ligados a mutações no gene *Dmd* localizado no braço curto do cromossomo X. O gene *Dmd*, localizado na região Xp21, é responsável pela produção da proteína distrofina. Essa proteína é uma das proteínas que formam o complexo glicoproteico necessário para a integridade da fibra muscular e sua disfunção causa a DMD e a BMD. Além disso, a distrofina é necessária para a fisiologia da retina e, portanto, para o processamento da informação visual para funções com visão de cores e de contrastes. **OBJETIVO:** Avaliar o impacto de diferentes tipos de alteração genética do gene *Dmd* na visão de cores e de contrastes dos pacientes com DMD e BMD. **METODOLOGIA:** O estudo compreendeu a avaliação visual de três grupos de sujeitos: i) pacientes com DMD (n = 87); pacientes com BMD (n = 10) e voluntários saudáveis (n = 41) com o uso de dois novos testes psicofísicos adaptados ao tablet - Tablet Color Vision Test (CVT), para discriminação cromática e Tablet Contrast Sensitivity Test (CST) para medir sensibilidade ao contraste espacial de luminância. O tablet CVT utiliza mosaicos de pequenos pontos nos quais o alvo (estímulo) e o fundo apresentam apenas diferenças cromáticas sem bordas e com uma variação da luminância para os eixos protan, deutan e tritan; enquanto, o tablet CST utiliza estímulos acromáticos estáticos (preto e branco) para as frequências espaciais: 0,8; 1,4; 2,0; 4,0; 10,0 e 16,0 ciclos por grau. **RESULTADOS:** Foram encontradas diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$) no limiar de discriminação cromática para os eixos protan, deutan e tritan entre o grupo controle e os subgrupos DMD separados de acordo com a alteração genética e também no grupo BMD utilizando o Tablet CVT. Foram também encontradas diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) na sensibilidade ao contraste espacial de luminância dos participantes com DMD comparados aos controles no Tablet CST nas frequências 0,8 cpg, 2,0 cpg e 4,0. No grupo BMD a sensibilidade ao contraste espacial não apresentou diferenças estatisticamente significantes. **CONCLUSÕES:** A discriminação cromática está prejudicada nos participantes com DMD e BMD nos eixos protan, deutan, tritan independentemente do local de alteração genética do gene *Dmd* e a sensibilidade ao contraste também está reduzida em participantes com DMD, mas sem alteração no grupo BMD. Os resultados contribuem para o melhor detalhamento da visão humana em relação aos diferentes tipos de mutação do gene *Dmd*, logo que mecanismos visuais afetados parecem relacionar-se com grande variedade das proteínas distrofinas.

Palavras-chave: Visão humana, Psicofísica, Distrofina, Distrofia muscular de Duchenne e Distrofia muscular de Becker.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Duchenne muscular dystrophy (DMD) and Becker muscular dystrophy (BMD) are neuromuscular disorders linked to mutations in the *Dmd* gene located in the short arm of the X chromosome. The *Dmd* gene, located in the Xp21 region, is responsible for the production of the protein dystrophin. This protein is one of the proteins that form the glycoprotein complex necessary for the integrity of the muscle fiber and its dysfunction causes DMD and BMD. In addition, dystrophin is required for retinal physiology and therefore for processing visual information for both color discrimination and contrast sensitivity. **OBJECTIVE:** To analyze the impact of different types of the *Dmd* gene alteration on the color discrimination and contrast sensitivity of patients with DMD and BMD. **METHODOLOGY:** The study comprised a visual evaluation of three groups of subjects: i) patients with DMD (n = 87); BMD patients (n = 10) and healthy volunteers (n = 41) using two new tablet-adapted psychophysical tests - Tablet Color Vision Test (CVT) for chromatic discrimination and Tablet Contrast Sensitivity Test (CST) for luminance spatial contrast sensitivity. The tablet CVT uses mosaics of small points in which the target (stimulus) and the background show only chromatic differences without borders and with a variation of luminance for the protan, deutan and tritan axes, while the CST tablet uses static achromatic stimuli (black and white) at spatial frequencies: 0.8; 1.4; 2.0; 4.0; 10.0 and 16.0 cycles per degree. **RESULTS:** Significant statistical differences ($p < 0.05$) were found in the color discrimination limit for the protan, deutan and tritan axes between the control group and the DMD subgroups according and also in the BMD group using the Tablet CVT. There were also statistically significant differences ($p < 0.05$) in the sensitivity to luminance contrast of participants with DMD compared to controls in the Tablet CST at spatial frequencies 0.8 cpd, 2.0 cpd and 4.0. In the BMD group, the sensitivity to spatial contrast did not present statistically significant differences. **CONCLUSIONS:** Impaired chromatic discrimination was found in participants with DMD and BMD on the protan, deutan, tritan axes, independently of the locus of genetic alteration and the same was found for contrast sensitivity in participants with DMD, but not in the BMD group. The results contribute to a better detailed of human vision regarding the different types of *DMD* gene mutation, as affected visual mechanisms seem to be related to a wide variety of dystrophin proteins.

Keywords: Human vision, Psychophysics, Dystrophin, Duchenne muscular dystrophy and Becker muscular dystrophy.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Acima: representação da localização do gene da distrofina no cromossomo X (xp21). Meio: linhas pretas verticais representam os 79 exons distribuídos em 2,5 milhões de bases; as setas indicam os sete promotores: os promotores B, M e P responsáveis pela transcrição do promotor muscular são considerados a primeira base do gene e as transcrições das outras isoformas são iniciadas por promotores localizados em outras regiões do gene: promotores R(retina), B3(cérebro), S (células de Schwann) e G (geral) que são responsáveis pelas isoformas Dp260, Dp140, Dp116 e Dp71, respectivamente. Abaixo: representações das diferentes isoformas da proteína. Adaptado de Muntoni et al.(2003).....19
- Figura 2.** Representação esquemática da secção transversal do globo ocular destacando as principais estruturas (A) e representação esquemática simplificada dos principais grupos celulares da retina (B) (Kolb, 2003).....21
- Figura 3.** Representação do campo receptivo centro ON da célula ganglionar. Quando o sinal luminoso incide no centro excitatório (acima), promove aumento na frequência de potenciais de ação e quando o mesmo sinal luminoso incide na periferia inibitória (abaixo) promove redução na frequência de potenciais de ação (Schwartz, 2009).....21
- Figura 4.** Aproximações dos espectros de absorção dos três cones humanos (cone S ~ 440 nanômetros (nm); cone M ~ 530 nm; cone L ~ 565 nm) (adaptado de Smith e Porkorny,1975 citado por Schwartz, 2009).....24
- Figura 5.** Função típica de sensibilidade ao contraste humano. A seta aponta para o corte de alta frequência. Observe que as coordenadas são plotadas em unidades de log. A abcissa representa 100% de contraste. (A sensibilidade ao contraste é recíproca do percentual de contraste limiar) (Modificado de Schwartz, 2009).....26
- Figura 6.** Na figura o contraste aumenta de cima para baixo e a frequência espacial aumenta da esquerda para direita. Observe que, à distância do comprimento do braço, as frequências espaciais intermediárias são vistas em contrastes mais baixos do que as frequências espaciais baixas ou altas (Retirado de Campbell e Robson, 1968 citado por Schwartz, 2009).....27
- Figura 7.** Representação dos subgrupos separados de acordo com a localização da alteração genética no gene *Dmd*.....30
- Figura 8.** Diagrama apresentando a localização dos exons responsáveis pela transcrição da distrofina, qual ou quais proteínas são afetadas dependendo da localização da alteração genética no gene da *Dmd*. A representação mostra a região upstream ao exon 30 (1 - 29 exon) e downstream ao exon 30 (30 - 79). Modificado de Yamoto et al., 2018.....32
- Figura 9.** Exemplo de imagem no monitor apresentando o estímulo "C" cromático e o ruído de luminância. A abertura da letra "C" está para o lado direito.....34
- Figura 10** Exemplo de imagem no monitor apresentando o estímulo para o Contrast Test mostrando as grades no lado esquerdo na frequência espacial 2.0 cpg.....35
- Figura 11.** Exemplos das telas de exame do Tablet CVT (A) mostrando um estímulo cromático mais saturado (esquerda) e menos saturado (direita) para o protocolo protan (acima) e igualmente para o protocolo tritan (abaixo). Em B exemplos das grades acromáticas senoidais do CST para diferentes frequências espaciais.....37
- Figura 12.** O gráfico ilustra os valores de mediana e quartis (25% e 75%) para os eixos protan (acima), deutan (centro) e tritan (abaixo) Não houve diferenças estatísticas encontradas entre os testes realizados no CCT e no Tablet CVT.....42

- Figura 13.** Resultados do exame de sensibilidade ao contraste espacial de luminância. O gráfico mostra a curva de sensibilidade ao contraste dos grupos avaliados no novo Tablet CST.....44
- Figura 14.** O gráfico ilustra os valores de mediana e quartis (25% e 75%) para os eixos protan (acima), deutan (centro) e tritan (abaixo) Diferenças estatísticas foram encontradas entre o grupo CTRL e todos os subgrupos DMD e no BMD.....47
- Figura 15.** O gráfico ilustra os valores de mediana e quartis (25% e 75%) para os eixos protan (acima), deutan (centro) e tritan (abaixo) Diferenças estatísticas foram encontradas entre o grupo CTRL e o grupo DMD UPSTREAM ao Exon 30 e no DMD DOWNSTREAM ao Exon 30.....50
- Figura 16.** Resultados de sensibilidade ao contraste espacial de luminância. O gráfico mostra a curva de sensibilidade ao contraste dos grupos avaliados no Tablet CST.....53
- Figura 17.** Resultados de sensibilidade ao contraste espacial de luminância. O gráfico mostra a curva de sensibilidade ao contraste dos grupos DMD UPSTREAM 30, DMD DOWNSTREAM 30 e o CTRL avaliados no Tablet CST.....55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Excluídos da amostra.....	30
Tabela 2. Comparação entre médias no CCT e o Tablet CVT.....	41
Tabela 3. Comparação entre mediana, quartis de 25% e 75% no CCT e o Tablet CVT.....	41
Tabela 4. Comparação entre Contrast Test e Tablet CST.....	43
Tabela 5. Características dos grupos comparados no Tablet CVT.....	44
Tabela 6. Resultados de mediana, quartis de 25% e 75% no Tablet CVT.....	45
Tabela 7. Características dos grupos Upstream 30 e Downstream 30 no Tablet CVT.....	48
Tabela 8. Resultados mediana, quartis de 25% e 75% no Tablet CVT subgrupos DMD UPSTREAM 30 e DMD DOWNSTREAM 30.....	49
Tabela 9. Características dos grupos comparados Tablet CST.....	51
Tabela 10. Resultados de sensibilidade ao contraste.....	52
Tabela 11. Características dos grupos DMD UPSTREAM 30 e DMD DOWNSTREAM Tablet CST.....	53
Tabela 12. Resultados de sensibilidade ao contraste dos grupos DMD UPSTREAM 30 e DMD DOWNSTREAM	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BMD - Distrofia muscular de Becker

CCT - Cambridge Colour Test

Cpg – ciclos por grau

CTRL – controles

DMD - Distrofia muscular de Duchenne

DMD 1 - alteração genética anterior ao exon 30 (comprometimento isolado da Dp427)

DMD 2 - alteração genética entre exons 30 e 45 (altera as proteínas Dp427 e Dp260)

DMD 3 - alteração genética entre os exons 45 e 62 (altera as proteínas Dp427, Dp260, Dp140)

DMD 4 - alteração genética a partir do exon 63 (alteração de todas as distrofinas retinianas Dp427, Dp260, Dp140 e Dp71)

ERG - Eletrorretinograma

FSC - Função de Sensibilidade ao Contraste

ISCEV - International Society For CLINICAL Electrophysiology Of Vision

MLPA - Multiplex ligation - dependent probe amplification

Tablet CVT - Tablet Color Test

Tablet CST - Tablet Contrast Sensitivity

UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo

USP - Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E DE BECKER.....	17
1.2. SISTEMA VISUAL E A DISTROFIA MUSCULAR.....	20
1.3. VISÃO DE CORES E DMD.....	23
1.4. SENSIBILIDADE AO CONTRASTE E DMD.....	26
2. JUSTIFICATIVA.....	28
3. OBJETIVOS.....	29
3.1. OBJETIVO GERAL.....	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
4. METODOLOGIA.....	29
4.1. SUJEITOS.....	29
4.2. APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA.....	31
4.3. AVALIAÇÃO OFTALMOLÓGICA.....	31
4.4. AVALIAÇÃO GENÉTICA.....	32
4.5. AVALIAÇÃO PSICOFÍSICA.....	33
4.5.1. CAMBRIDGE COLOUR TEST (CCT).....	33
4.5.2. CONTRAST TEST.....	34
4.5.3. DISPOSITIVO PORTÁTIL – TABLET.....	36
4.5.3.1. TESTES PSICOFÍSICOS NO TABLET.....	36
4.5.3.2. TABLET COLOR TEST (TABLET CVT).....	38
4.5.3.3. TABLET CONTRAST SENSITIVITY (TABLET CST).....	39
4.6. ANÁLISE DE DADOS.....	40
5. RESULTADOS.....	41
5.1. COMPARAÇÃO ENTRE CCT E TABLET CVT.....	41
5.2. COMPARAÇÃO ENTRE CONTRAST TEST E TABLET CST.....	43
5.3. RESULTADOS TABLET COLOR TEST (TABLET CVT).....	44
5.4. LIMITE SUPERIOR DE NORMALIDADE TABLET COLOR TEST.....	51
5.5. RESULTADOS TABLET CONTRAST SENSITIVITY.....	51
6. DISCUSSÃO.....	56
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	59
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
9. ANEXOS.....	67
9.1. APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA.....	67

9.2. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	72
9.3. TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	75
10. APÊNDICES.....	77
10.1. APÊNDICE 1: ESTATÍSTICA CCT E TABLET CVT E ESTATÍSTICA CONTRAST TEST E TABLET CST	77
10.2. APÊNDICE 2: ESTATÍSTICA TABLET CVT.....	78
10.3. APÊNDICE 3: LIMITE SUPERIOR DE NORMALIDADE NO TABLET CVT.....	79
10.4. APÊNDICE 4: RESULTADOS ESTATÍSTICOS TABLET CST.....	86
10.5. APÊNDICE 5: RESULTADOS ESTATÍSTICOS ENTRE AS IDADES....	89

1. INTRODUÇÃO

1.1. Distrofia Muscular de Duchenne e de Becker

Distrofia muscular de Duchenne e distrofia muscular de Becker são distúrbios neuromusculares recessivos ligados a mutações no gene *Dmd*, código do gene: 300377(Online Mendelian Inheritance in Man, 2019), ele está localizado no braço curto do cromossomo X (Zatz, Vianna-Morgante, Campos, & Diament, 1981, Koenig et al., 1987). O gene *Dmd* localiza-se na região Xp21, sendo responsável pela produção da proteína distrofina (Hoffman, Brown, Jr., & Kunkel, 1987; Hoffman et al., 1988). A distrofia muscular de Duchenne (DMD), afeta um em 3600 – 6000 nascidos vivos do sexo masculino (Bushby et al., 2010) e é considerada a forma mais comum das distrofias musculares que afetam os seres humanos (O'Brian & Kunkel, 2001). O comprometimento com maior impacto no cotidiano dos pacientes é nos músculos, entretanto também pode afetar órgãos e o sistema nervoso central (Yaffe et al., 1992; Emery, 2001).

Por ser uma doença genética recessiva ligada ao cromossomo X, na maioria dos casos de distrofia muscular a doença é transmitida ao filho do sexo masculino pela mãe portadora (heterozigota). Contudo, um terço dos casos é devido a mutações novas (Zatz, Lange, & Spence, 1977, Barbujani et al., 1990). Deleções ou duplicações gênicas ocorrem na maior parte dos pacientes, mas 30% dos pacientes possuem mutação de ponto (Verbovaia & Razin, 1997; Sitnik et al., 1997).

As crianças afetadas pela DMD começam a apresentar dificuldades para subir escadas e realizar alguns movimentos entre 3 e 5 anos de idade (O'Brien & Kunkel, 2001). Normalmente, a deficiência muscular se agrava rapidamente e o indivíduo torna-se dependente da cadeira de rodas no início da adolescência (para revisão ver Emery, 2001; Moura, 2009). A evolução motora da doença se deve a uma fraqueza muscular progressiva, irreversível, devido à disfunção da musculatura esquelética como consequência da deficiência da proteína distrofina. A DMD manifesta-se a partir do início da infância e apresenta uma evolução rápida. Em geral, os pacientes com DMD morrem até o final da segunda década de vida por falência cardíaca e respiratória (Hauser & Chamberlain, 1996; Anderson, Head, Rae, & Morley, 2002).

A distrofia muscular de Becker (BMD) é menos comum que a DMD, mas a fraqueza muscular é semelhante, histológica e anatomopatologicamente, apenas com períodos de início (em média 11 anos de idade) e de óbito do paciente (em média 42 anos de idade) mais tardios. A incidência é menor do que a DMD, ocorrendo 1 caso a cada 30.000 nascimentos masculinos. Isso ocorre porque as alterações genéticas permitem a expressão de proteínas que garantem certa função muscular, produzindo uma forma mais branda de distrofia muscular. Cerca de 65% dos afetados pela BMD também apresenta deleções no gene da distrofina, portanto a distrofina encontra-se alterada quantitativa ou qualitativamente (Kennedy, 1995; Diament, 1998; Oliveira, 2002).

A figura 1 apresenta um esquema de localização do gene da distrofina no cromossomo X com os sete promotores dos quais três, chamados B, M e P, são responsáveis pela transcrição da proteína completa (Dp427) com 3685 aminoácidos distribuídos em 180 nm de comprimento (Blake & Kroger, 2000; Essex & Roper, 2001; Fortina et al., 1997; Mehler, 2000; Nobile, Marchi, Nigro, Roberts, & Danieli, 1997).

Cada promotor está associado a uma determinada proteína que expressa: Dp427(B), Dp427(M) e Dp427(P). A letra indica o local de expressão da proteína: B: cérebro, M: músculo e P: células de Purkije. A diferença entre os três tipos de proteínas Dp427 encontra-se na sequência de aminoácidos de um dos seus domínios, o terminal N (Blake et al., 2002).

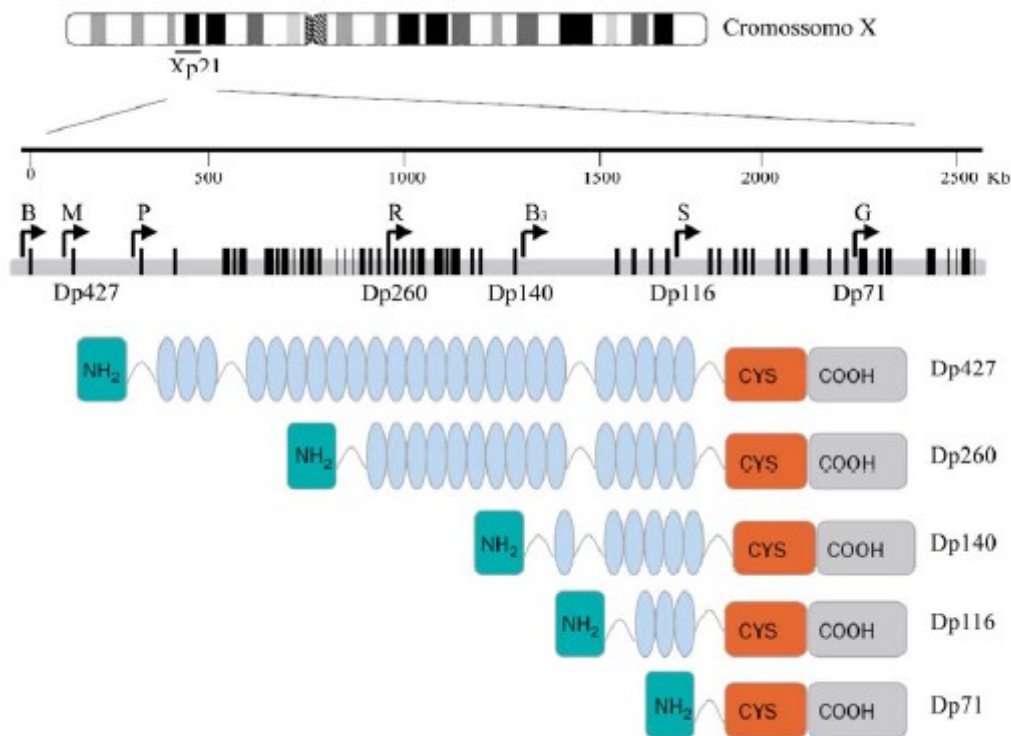


Figura 1. Acima: representação da localização do gene da distrofina no cromossomo X (xp21). Meio: linhas pretas verticais representam os 79 exons distribuídos em 2,5 milhões de bases; as setas indicam os sete promotores: os promotores B, M e P responsáveis pela transcrição do promotor muscular são considerados a primeira base do gene e as transcrições das outras isoformas são iniciadas por promotores localizados em outras regiões do gene: promotores R(retina), B3(cérebro), S (células de Schwann) e G (geral) que são responsáveis pelas isoformas Dp260, Dp140, Dp116 e Dp71, respectivamente. Abaixo: representações das diferentes isoformas da proteína. Adaptado de Muntoni et al.(2003).

Segundo Blake e Kroger (2000) os músculos esqueléticos e cardíacos são os mais afetados na DMD, pois nesses tecidos a Dp427 possui função estrutural, responsável por manter a integridade da membrana celular durante o processo de contração e alongamento da fibra muscular. A proteína Dp260 é expressa na retina humana e possui função, na comunicação sináptica da camada plexiforme externa (D'Souza et al., 1995). Por sua vez, em tecidos neurais as proteínas Dp427 e Dp140 participam da sinaptogênese e da homeostase de Ca^{2+} , estando relacionadas aos canais iônicos dos neurônios (Mehler, 2000). Na literatura encontra-se que 30% dos jovens com DMD apresentam retardo mental associado com a alteração genética pela disfunção da isoforma Dp140 (Gilberto, Ferreiro, Dalamon, & Szijan, 2004).

Também há outras proteínas distrofina expressas em grupos celulares difusos, como: Dp116 nas células de Schwann (Byers, Lidov, & Kunkel, 1993); Dp71 distribuída em órgãos como fígado, pulmão, rim (Bar et al., 1990) e no sistema nervoso central (Rapaport et al., 1992, 1993; Jung et al., 1993).

1.2. SISTEMA VISUAL E A DISTROFIA MUSCULAR

O processamento da informação visual tem início na retina. Nas figuras 2A e 2B (Kolb, 2003) são apresentadas as principais estruturas do globo ocular humano e dos principais grupos celulares retinianos.

As camadas mais externas da retina são formadas por grupos celulares que efetuam os primeiros estágios do processamento da informação visual: fotorreceptores, células bipolares ON e OFF e células horizontais. A principal função dos fotorreceptores é transformar a luz (energia eletromagnética) em sinal neural através do processo de fototransdução (modulação da liberação do neurotransmissor glutamato pelos fotorreceptores). Os cones e bastonetes são o elo inicial do sistema de visão, ou sistema que forma imagens, enquanto as células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis participam do sistema ativado por luz, mas que não forma imagens e tem funções ligadas ao ritmo circadiano e ao controle do reflexo pupilar, dentre outras funções que não requerem a formação de imagens (Dacey et al., 2005).

Nos cones há dois tipos de contato sináptico: em células bipolares do tipo ON o processo dendrítico da célula bipolar se localiza dentro da invaginação do pedículo, enquanto nas de tipo OFF há contato simples na superfície externa do pedículo do cone (Davson, 1980; Rodieck, 1998). As células bipolares tipo ON invertem os sinais recebidos dos fotorreceptores porque os processos dendríticos dessas células possuem receptores metabotrópicos de glutamato. Enquanto, as células bipolares com processos dendríticos fora da invaginação possuem receptores ionotrópicos de glutamato, portanto conservam os sinais recebidos dos fotorreceptores, e são consideradas tipo OFF (Rodieck, 1998).

Na Figura 3, observa-se que a informação encaminhada pelas células bipolares ao centro do campo receptivo tem um efeito oposto ao da informação encaminhada para periferia do campo receptivo (Schwartz, 2009). Existem células que respondem a

excitação no centro do campo receptivo e inibição na periferia e outras com a resposta contrária, ou seja, inibição no centro e excitação na periferia. Respostas a oponência cromática também são encontradas, para verde-vermelho e azul-amarelo.

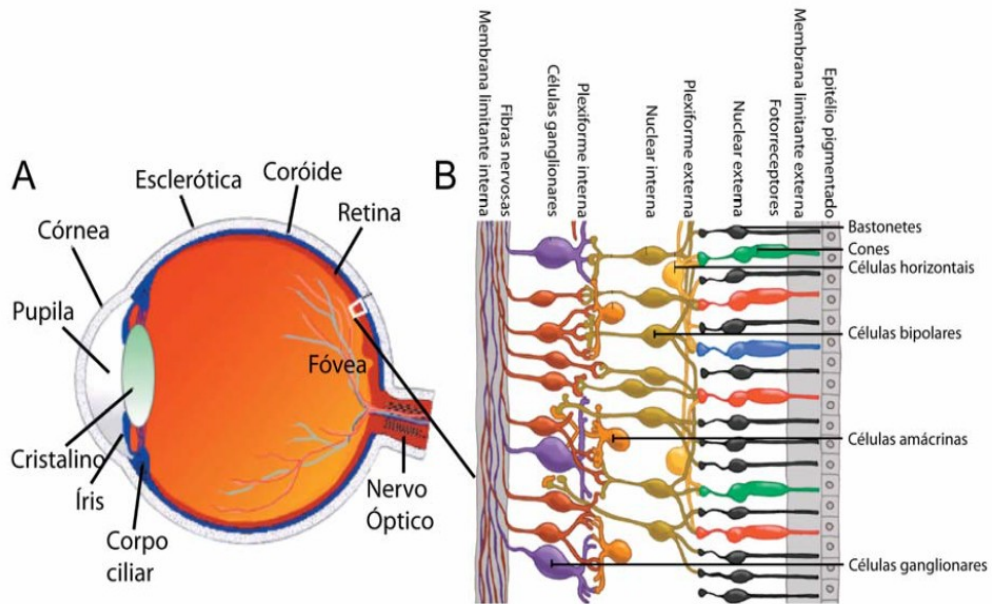


Figura 2. (A) Representação esquemática da secção transversal do globo ocular destacando as principais estruturas; (B) representação esquemática simplificada dos principais grupos celulares da retina (legendas horizontais) e identificação das dez camadas da retina (legendas verticais) (Kolb, 2003).

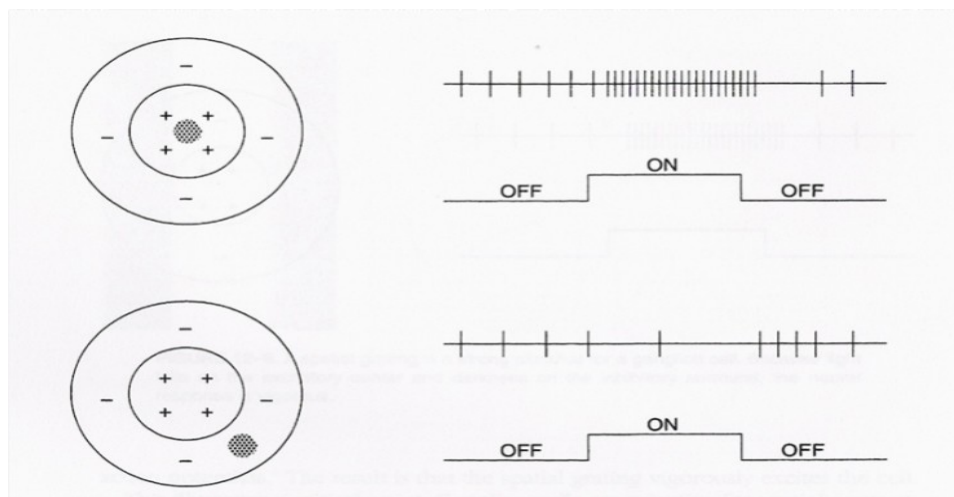


Figura 3. Representação do campo receptivo centro ON de uma célula ganglionar. Quando o sinal luminoso incide no centro excitatório (acima), promove aumento na frequência de potenciais de ação e quando o mesmo sinal luminoso incide na periferia inibitória (abaixo) promove redução na frequência de potenciais de ação (Schwartz, 2009).

No sistema visual a disfunção da distrofina está associada às alterações eletrofisiológicas retinianas encontradas tanto em modelos animais da DMD como em pacientes (Cibis, Fitzgerald, Harris, Rothberg, & Rupani, 1993; Pillers et al., 1995; Drenckhahn, Holbach, Ness, Schmitz, & Anderson, 1996; Schmitz & Drenckhahn, 1997, Tsai et al., 2016; Bucher et al., 2019). Jovens com DMD apresentam redução da amplitude da onda-b do eletrorretinograma (ERG) escotópico (adaptado ao escuro) (Cibis et al., 1993; Debecker, Riddell, Dooley, & Tremblay, 1994; Fitzgerald, Cibis, Giambrone, & Harris, 1994; Girlanda et al., 1997; Pascual-Pascual, Molano, & Pascual-Castroviejo, 1998; Pillers et al., 1993; Sigesmund et al., 1994;).

O ERG registra as somas de sinais elétricos produzidos pela retina em resposta à estimulação por flash de luz de curta duração (Brown, 1964; Pillers, 1999). Os sinais elétricos podem variar conforme a adaptação do sistema visual e as características temporais, espectrais e de luminância da luz (Perlman, 1995). A medida eletrorretinográfica mais frequente utilizada é o ERG de campo total, em que o estímulo luminoso atinge regiões centrais e periféricas da retina, as respostas geradas pela estimulação de flashes de luz apresentam uma onda complexa, com diferentes componentes, como a onda-a, a onda-b, a onda-c e a onda-d (Frishman, 2006).

Segundo Marmor et al. (2004; 2009) para avaliação das vias visuais ON e OFF através do ERG de campo total, não há, atualmente, protocolos recomendados pela International Society for Clinical Electrophysiology of Vision (ISCEV). Entretanto o protocolo fotópico (adaptado ao claro) que utiliza um estímulo com flash de longa duração (~200 ms) é considerado pela ISCEV um tipo especializado de ERG de campo total para avaliação da atividade das vias ON e OFF dos cones. Além disso, outra alternativa que permite avaliar a atividade das vias ON e OFF dos cones é o protocolo de estimulação intermitente (flicker) com modulação da luminância em dente de serra (Kremers, Lee, Pokorny, & Smith, 1993).

Mais recentemente, o grupo do Laboratório da Visão da Universidade de São Paulo, mostrou que existe um prejuízo assimétrico da atividade retiniana em pacientes com DMD, com a via visual ON sendo mais afetada que a via visual OFF (Barboni et al., 2013). Essa alteração assimétrica causa desequilíbrio na atividade da via visual responsável pelo processamento da informação visual de contraste cromático, ou seja,

via parvocelular (Barboni et al., 2016) que explicaria, ao menos em parte, os prejuízos na visão de cores encontrados em pacientes com DMD (Costa et al., 2007a).

1.3. VISÃO DE CORES E DMD

Thomas Young, em 1802, propôs um modelo de visão de cores. Em suas próprias palavras:

“Como é quase impossível conceber cada ponto sensível da retina para conter um número infinito de partículas, cada uma capaz de vibrar em perfeita harmonia com todas as ondulações possíveis, torna-se necessário supor que o número seja limitado; por exemplo, para as três cores primárias: vermelho, amarelo e verde... e que cada uma das partículas é capaz de ser posta em movimento mais ou menos à força por ondulações que diferem menos ou mais da perfeita harmonia. Cada filamento sensível do nervo pode consistir em três porções, uma para cada cor principal (Parsons, 1931, p. 123).

Embora a terminologia seja datada, Young formulou uma teoria na qual a ciência moderna da visão de cores se baseia. Ele postulou que as informações de cores são codificadas por um número limitado de tipos de cone, talvez três, e que as atividades relativas desses diferentes tipos de cone codificam cores. A teoria que incorpora este e conceitos relacionados é referida como a teoria tricromática (Schwartz, 2009). Entretanto, é preciso acrescentar que a visão de cores depende não apenas da existência de fotorreceptores, mas também de um processamento neural em que a ativação neural que decorre das entradas espectrais provenientes dos diferentes receptores é comparada por uma organização neural dos neurônios subsequentes da retina e do sistema nervoso central.

Sabe-se hoje que a maioria dos humanos tem visão tricromática, baseada na existência de três fotopigmentos em diferentes tipos de cones (Cones L – sensibilidade máxima nos comprimentos de onda longos; Cones M – sensibilidade máxima em comprimentos de onda médios; Cones S – sensibilidade máxima nos comprimentos de onda curtos) com diferentes espectros de absorção sobrepostos (Schwartz, 2009). As curvas de sensibilidade espectral de cones do sistema visual humano são apresentadas na Figura 4.

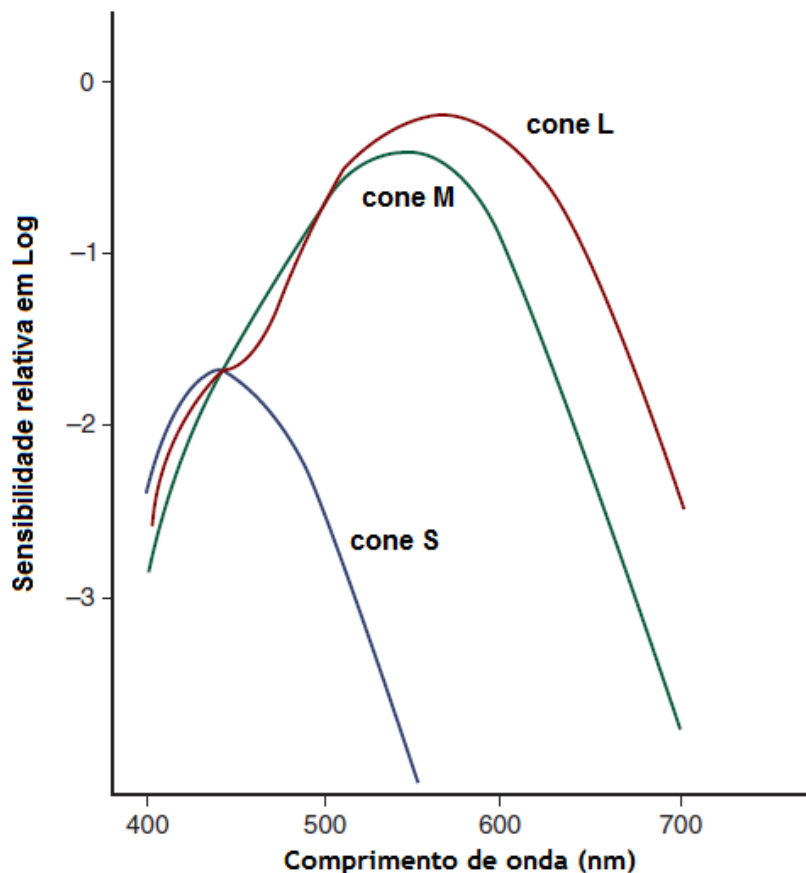


Figura 4. Aproximações dos espectros de absorção dos três cones humanos (cone S ~ 440 nanômetros (nm); cone M ~ 530 nm; cone L ~ 565 nm) (adaptado de Smith e Pokorny, 1975 citado por Schwartz, 2009).

A coexistência dos genes da distrofina e das opsinas verde e vermelha no cromossomo X estimulou vários estudos. Foram encontradas famílias com discromatopsia e DMD, nas quais estudos de ligação genética foram realizados. A conclusão, contudo foi de que não há ligação genética entre estas duas situações. Segue um resumo desses estudos.

Em estudo inicial de Philip, Walton e Smith (1956) em uma família com DMD os autores verificaram alteração nas respostas às cores vermelho-verde (protan/deutan), utilizando as pranchas de Ishihara. Como hipótese para explicar esse resultado foi suposta uma interação (crossing-over) entre o gene *Dmd* e das opsinas vermelho-verde, com a conclusão de que havia um percentual de 25% de casos que nasceram com discromatopsia e DMD.

Emery (1966) também estudou a ligação genética entre os casos da cegueira de cores e de DMD. Quatro famílias avaliadas, 3 famílias com DMD e defeito deutan e uma família com DMD e defeito protan. Os resultados foram similares ao de Philip et al. (1956). Foram encontrados três descendentes com a alteração deutan em um total de sete e um com alteração protan em três descendentes. Ao fim, o autor conclui que o número de participantes é muito pequeno para tirar conclusões em relação à aparente diferença nas frações de recombinações para os dois tipos de alteração na visão das cores. Também mostram que os genes para opsinas verde e vermelha e DMD estão distantes no cromossomo X e não estão suficientemente próximos para terem utilidade como indicadores que o paciente seria um portador ou para identificar casos pré-clínicos da DMD.

Por outro lado estudos com ERG mostraram relações fenótipo-genótipo em pacientes com DMD. Sigismund et al. (1994) registraram ERGs em 21 pacientes com DMD e em 5 com BMD. O objetivo foi definir o fenótipo visual associado às mutações no gene DMD. Os resultados mostraram que 23 (88%) dos pacientes tinham redução da onda b escotópica do ERG e que pacientes com alterações na região do meio do gene tiveram maiores reduções das amplitudes escotópicas da onda b de que aqueles com deleções no início do gene. No estudo a maioria dos pacientes não tinha alteração na visão de cores, com apenas um caso grave e um caso moderado de alteração protan/deutan. Também houve um caso de alteração tritan moderada. O estudo concluiu que a maioria dos pacientes com DMD e BMD apresenta ERGs escotópicos anormais e que nos pacientes com deleções na região central do gene as alterações do ERG são mais graves. Ademais, o estudo traz embasamento para a ideia de que a distrofina possa desempenhar um papel na neurotransmissão retiniana. Contudo, pouco se sabe sobre a contribuição de cada isoforma da proteína distrofina para a fisiologia da retina e para a percepção visual. Sabe-se que mutações no gene DMD que afetam a expressão da Dp260, alteram o funcionamento de mecanismos retinianos específicos (Sigismund et al., 1994; Fitzgerald et al., 1994; Costa et al., 2007a; Barboni et al., 2013; Barboni et al., 2016).

Além disso, pacientes que possuem mutação genética a partir do exon 30, com comprometimento da expressão de uma, de algumas ou de todas as proteínas

menores, apresentam alterações na percepção visual sem comprometimento da acuidade visual (AV) (Costa et al.,2007b).

1.4. SENSIBILIDADE AO CONTRASTE E DMD

A sensibilidade ao contraste é a recíproca da quantidade mínima de contraste necessária para detectar uma grade de uma frequência espacial específica (Cornsweet, 1970). Se uma grade espacial for apresentada a um sujeito com contraste de luminância muito baixo esta poderá não ser visível. Mas se o contraste for aumentado pode-se chegar ao ponto em que passe a ser vista. Este valor de contraste pode ser determinado para diferentes frequências espaciais. A recíproca do valor de contraste limiar é a sensibilidade ao contraste para a grade. Limiares determinados para um grande número de diferentes frequências espaciais, resultam em um gráfico que mostra a sensibilidade ao contraste em função da frequência espacial (Schwartz, 2009).

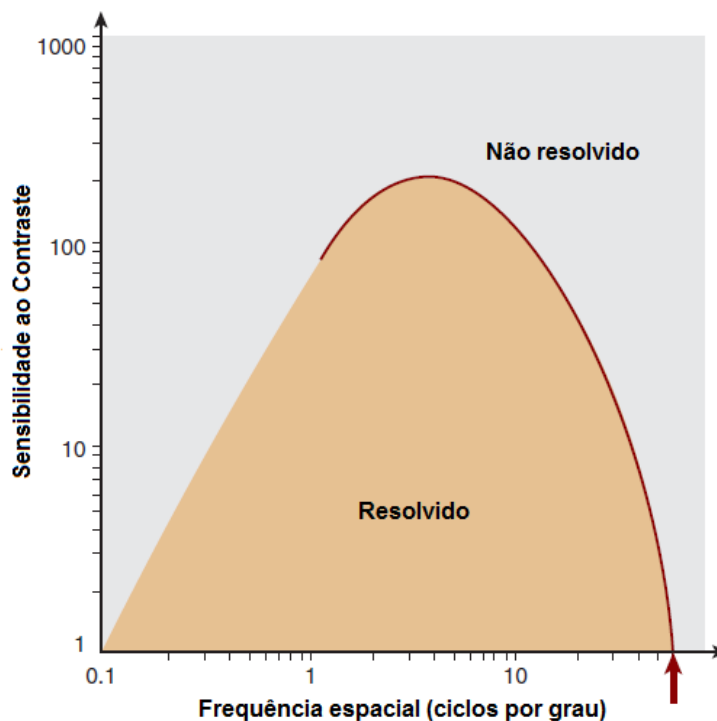


Figura 5. Função típica de sensibilidade ao contraste humano. A seta aponta para o corte de alta frequência. Observe que as coordenadas são plotadas em unidades de log. A abcissa representa 100% de contraste. (A sensibilidade ao contraste é recíproca do percentual de contraste limiar) (Modificado de Schwartz, 2009).

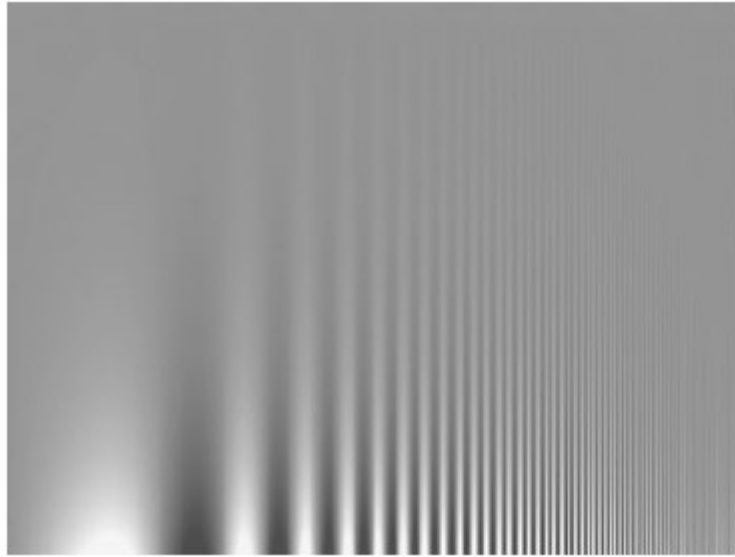


Figura 6. Na figura o contraste aumenta de cima para baixo e a frequência espacial aumenta da esquerda para direita. Observe que, à distância do comprimento do braço, as frequências espaciais intermediárias são vistas em contrastes mais baixos do que as frequências espaciais baixas ou altas (Retirado de Campbell e Robson, 1968 citado por Schwartz, 2009).

A função de sensibilidade ao contraste tem uma forma de banda de passagem, com maior sensibilidade nas frequências espaciais médias, e redução de sensibilidade tanto em baixas como nas altas frequências espaciais como pode ser observado na figura 5 (Cornsweet, 1970; Schwartz, 2009)

Há poucos estudos que avaliaram a sensibilidade ao contraste na DMD. No estudo de Costa et al. (2011) sobre função visual em crianças com DMD foi medida a sensibilidade ao contraste espacial, temporal e cromático vermelho-verde e azul-amarelo de crianças com DMD com alterações upstream ao exon 30 e downstream ao exon 30. Os resultados mostraram redução na sensibilidade ao contraste espacial de luminância nos pacientes com DMD com deleção downstream ao exon 30. Os resultados foram semelhantes para contraste temporal de luminância. Por sua vez, a sensibilidade ao contraste cromático vermelho-verde foi reduzida também em pacientes com deleção downstream ao exon 30, enquanto a sensibilidade cromática azul-amarelo não mostrou diferenças significativas. A conclusão é que a função visual é prejudicada em crianças com DMD. Além disso, foi relatada uma relação genótipo-fenótipo relacionada à alteração visual downstream ao exon 30, em que a isoforma retiniana da distrofina Dp260 está afetada. Em outro estudo utilizando o teste psicofísico do xadrez

(Costa, 2011) para avaliar a sensibilidade a incremento (contraste positivo) e a decremento (contraste negativo) da luminância média em relação ao fundo, verificou-se que houve redução significativa da sensibilidade ao contraste positivo nos pacientes com DMD relativa aos controles (Costa, 2011; Barboni et al., 2013).

2. JUSTIFICATIVA

O desconhecimento da contribuição de cada uma das principais deleções ou mutações da distrofina na DMD ou BMD impede que se tenha uma ideia aprofundada da ação destas proteínas na fisiologia da retina. Algumas das alterações genéticas são mais frequentes que outras. Portanto, para que se possa entender o papel dessas alterações no funcionamento do sistema visual é preciso ter acesso a um número grande de pacientes afim de que haja um número significativo em cada uma das principais alterações nas proteínas do gene *Dmd* (Dp427, Dp260, Dp140, Dp116 e Dp71).

Um grande empecilho para realização de pesquisas com pacientes com DMD e BMD é a sua dificuldade de locomoção e transporte, pois muitos utilizam cadeiras de rodas e dependem de transporte adaptado ou ambulância para virem ao Laboratório de Visão do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo (USP) para realizar a avaliação. Além disso, parte dos pacientes reside em municípios do interior de São Paulo ou morar em outros Estados, o que implica em uma baixa adesão aos convites para participar como voluntários das pesquisas desenvolvidas com os testes no laboratório.

Diante destas dificuldades, a solução encontrada foi o desenvolvimento de testes portáteis para aplicação nos locais onde os pacientes fazem acompanhamento médico, e frequentam rotineiramente. A portabilidade e rapidez de aplicação dos testes permitiria atender ao maior número possível de pacientes com DMD e BMD.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o impacto de diferentes tipos de alteração genética no gene Dmd na visão dos pacientes com distrofia muscular de Duchenne e distrofia muscular de Becker com utilização de dois novos testes psicofísicos de visão de cores e sensibilidade ao contraste de luminância espacial num dispositivo portátil (Tablet).

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparação em voluntários saudáveis de resultados dos testes psicofísicos desenvolvidos para Tablet com os resultados dos testes de laboratório utilizados em pesquisas anteriores: Cambridge Colour Test (CCT) e Visage Contrast Test (Cambridge Research Systems, Rochester, UK).

Comparação dos resultados obtidos em pacientes com distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular de Becker e voluntários saudáveis.

4. METODOLOGIA

4.1. SUJEITOS

O estudo compreendeu a avaliação visual de três grupos de sujeitos: i) pacientes com DMD; pacientes com BMD e voluntários saudáveis (grupo controle).

Foram incluídos no estudo apenas os resultados dos sujeitos que se encaixaram nos critérios de inclusão. Os critérios de inclusão utilizados foram: acuidade visual corrigida de, no mínimo, 20/20 em ambos os olhos, ausência de doenças oculares e/ou sistêmicas que possam afetar os resultados dos testes e compreensão verbal das instruções dos testes.

Os grupos de estudo DMD e BMD foram compostos por pacientes que fazem acompanhamento médico e terapias no Centro de Estudos sobre o Genoma Humano e Células-Tronco da USP e do Setor de Investigações nas Doenças Neuromusculares da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

Participaram do estudo 138 sujeitos (41 controles e 97 pacientes). A população incluída na análise de dados foi dividida em três grandes grupos: controles (CTRL, n =

41, idade média = $15,7 \pm 6,1$ anos), pacientes com distrofia muscular de Becker (BMD, N = 10, idade média = $26,9 \pm 11,9$ anos) e pacientes com distrofia muscular de Duchenne (DMD, n = 87, idade média = $13,1 \pm 4,3$ anos).

O grupo de pacientes com DMD foi dividido em subgrupos (figura 7) dependendo do resultado do exame molecular que definiu a localização da alteração genética no gene *Dmd*:

- DMD 1 = alteração genética anterior ao exon 30 (comprometimento isolado da Dp427);
- DMD 2 = alteração genética entre exons 30 e 45 (altera as proteínas Dp427 e Dp260);
- DMD 3 = alteração genética entre os exons 45 e 62 (altera as proteínas Dp427, Dp260, Dp140);
- DMD 4 = alteração genética a partir do exon 63 (alteração de todas as distrofins retinianas Dp427, Dp260, Dp140 e Dp71).

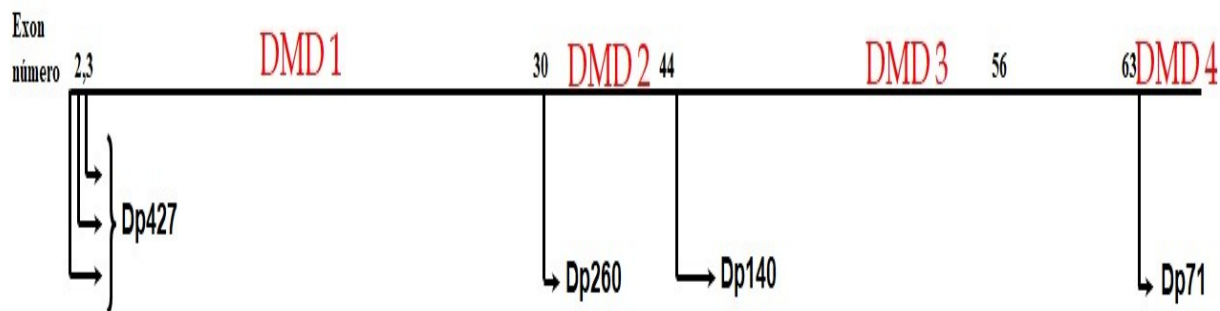


Figura 7. Representação dos subgrupos separados de acordo com a localização da alteração genética no gene *Dmd*.

Também foi excluído da pesquisa um total de 28 participantes com problemas variados (tabela 1):

Tabela 1. Excluídos da amostra

N	Motivo
7	Dificuldade para manter a atenção até o final do teste.
5	Começaram o teste, mas não terminaram (não queriam mais participar e apertavam a tela do tablet de qualquer maneira).
5	Somente diagnóstico clínico da DMD.
4	Não realizaram o teste, pois precisavam ir embora com a ambulância da

	prefeitura.
3	Dificuldades cognitivas de compreensão das instruções (suspeita de déficit intelectual).
2	Catarata afetando a acuidade visual.
2	Diagnóstico de Transtorno do Espectro Autista com dificuldades para compreender as instruções do teste.

A tabela 1 mostra que o principal motivo de exclusão foi a dificuldade de manter a atenção durante os testes, seguido de dificuldade em terminar os testes e de ausência de diagnóstico genético.

4.2. APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA

Os experimentos aderiram aos princípios da Declaração de Helsinki e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo (Processo Plataforma Brasil CAAE nº 80512617.6.0000.5561).

Antes de iniciar os testes, a pesquisa foi explicada aos responsáveis e ao participante. Solicitou-se que os pais assinassem o termo de consentimento e a criança/adolescente assinasse o termo de assentimento autorizando a participação na pesquisa. Os testes psicofísicos foram iniciados após o participante realizar o Teste de Leitura para Perto (37cm - Tabela de Jaeger).

4.3. AVALIAÇÃO OFTALMOLÓGICA

A avaliação da acuidade visual de pacientes e controles foram realizados utilizando a tabela de Snellen ou aplicando o Teste de Jaeger (leitura para perto - 37cm). Nos pacientes com queixas visuais ou acuidade visual alterada foi realizado exame oftalmológico com avaliação por biomicroscopia, fundoscopia, refração e motilidade ocular extrínseca no Laboratório da Visão da USP com o oftalmologista da equipe. Os equipamentos utilizados para a avaliação foram Lâmpada de Fenda (TOPCON LS-3E), projetor automático de optotipos (HUVITZ HCP-7000), oftalmoscópio (WELLCH-ALLYN 3000) e refratômetro (LUXVISION LXR-1500).

4.4. AVALIAÇÃO GENÉTICA

Os pacientes que fazem acompanhamento médico no Centro de Estudos sobre o Genoma Humano e Células-Tronco da USP e no Setor de Investigações nas Doenças Neuromusculares da UNIFESP geralmente possuem diagnóstico molecular que especifica o tipo e o local da mutação no gene da *Dmd*. Esse resultado é obtido através da coleta de sangue do paciente para extração do DNA e subsequente reação MLPA (do inglês: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification). A reação foi realizada de acordo com as instruções do fabricante (MRC-Holland, Amsterdã, Holanda) e os produtos resultantes foram separados por eletroforese capilar. O resultado permite saber se há uma deleção ou uma duplicação no gene da *Dmd*. Dependendo do(s) exon(s) alterado(s) haverá comprometimento na expressão de diferentes formas da proteína distrofina (figura 8). Todos os resultados genéticos fornecidos na pesquisa foram cedidos como parte da nossa colaboração com o Genoma Humano e Células-Tronco da USP e o Setor de Investigações nas Doenças Neuromusculares da UNIFESP.

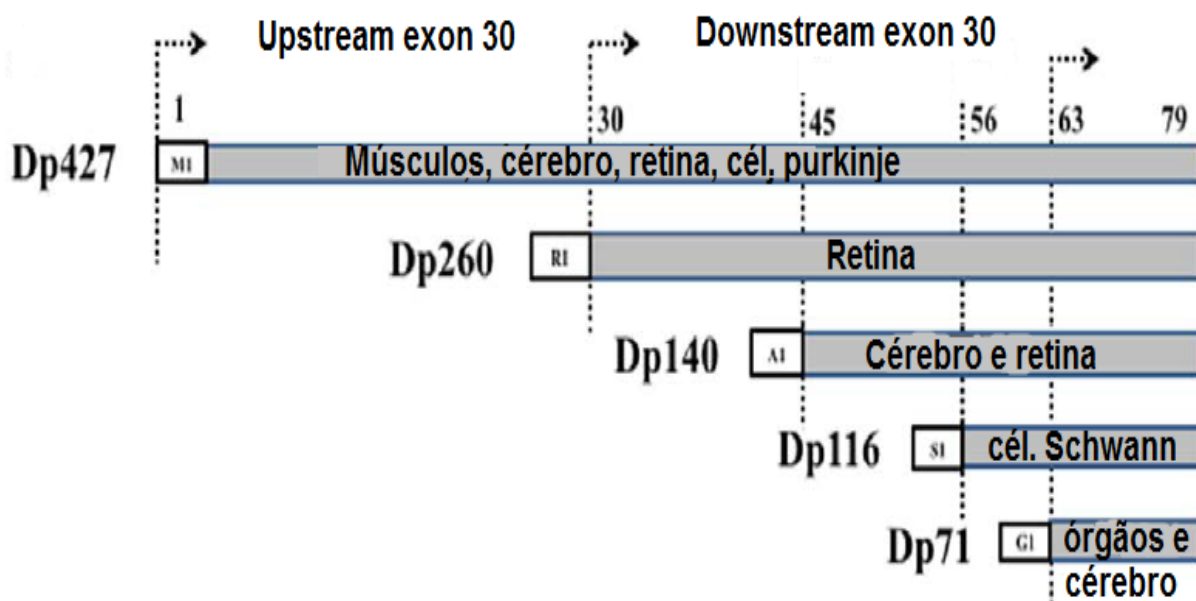


Figura 8. Diagrama apresentando a localização dos exons responsáveis pela transcrição da distrofina, qual ou quais proteínas são afetadas dependendo da localização da alteração genética no gene da *Dmd*. A representação mostra a região UPSTREAM ao exon 30 (1 - 29 exon) e DOWNSTREAM ao exon 30 (30 - 79). Modificado de Yamoto et al., 2018.

4.5. AVALIAÇÃO PSICOFÍSICA

Em uma primeira etapa voluntários saudáveis (controles) foram avaliados nos testes desenvolvidos para tablet Color Test (CVT) e Tablet Contrast Sensitivity Test (CST) e seus resultados foram comparados aos obtidos nos testes padrões aplicados no laboratório para avaliação da discriminação cromática e sensibilidade ao contraste: Cambridge Colour Test (CCT) e Contrast Test. Somente após essa etapa os testes tiveram início em pacientes.

4.5.1. CAMBRIDGE COLOUR TEST (CCT)

O CCT é um teste computadorizado de discriminação cromática em que os estímulos apresentados são semelhantes aos que constituem as placas pseudoisocromáticas do teste de Ishihara, contudo os resultados não são comparáveis. São avaliados três eixos de discriminação cromática de modo simultâneo: protan, deutan e tritan.

O alvo consiste em uma letra "C" que difere em cromaticidade do fundo (com coordenadas 0.1977, 0.4689 em u'v' do espaço de cor CIE 1976). Os participantes são posicionados a 3 metros de distância do monitor em sala escura. O alvo e o fundo são constituídos por círculos de tamanhos variados e com 6 níveis de luminância (entre 8 e 18 cd/m²) distribuídos de maneira aleatória. A tarefa do observador é informar em que posição se encontra a abertura do "C", esquerda, direita, em cima ou em baixo (figura 9). A duração média de aplicação é de aproximadamente 15 minutos. A tarefa é relativamente simples e as orientações são facilmente compreendidas pelos participantes.

O equipamento possui a versão do CCT V2.0 Cambridge Research Systems, Rochester, UK) instalado em notebook (Dell Dimension XTC -600), com placa gráfica VSG 2/5 (Cambridge Research Instruments, Rochester, UK). O monitor utilizado para geração dos estímulos foi o SONY FD Trinitron GDM-F500T9 de alta resolução (figura 10), com placa gráfica VSG 2/5 (Cambridge Research Systems, Rochester, UK).

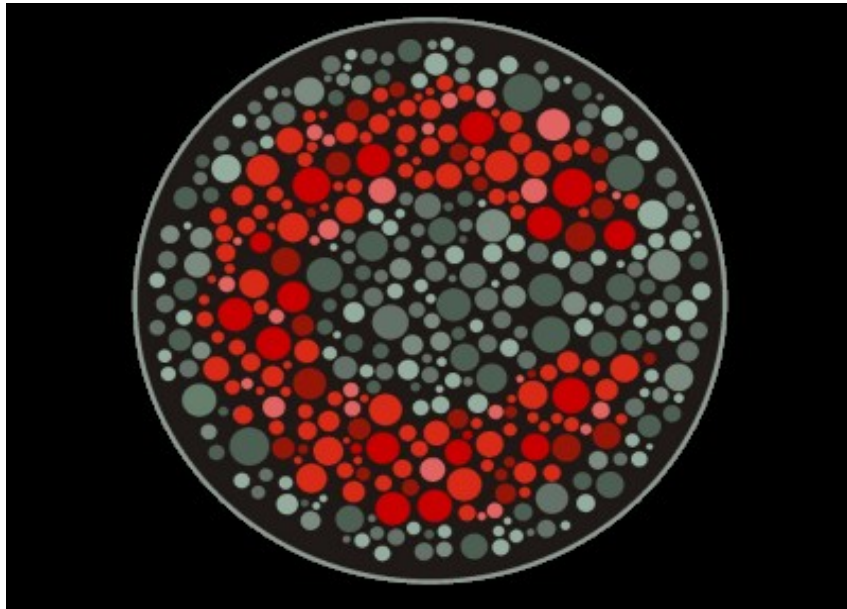


Figura 9. Exemplo de imagem no monitor apresentando o estímulo "C" cromático e o ruído de luminância. A abertura da letra "C" está para o lado direito.

4.5.2. CONTRAST TEST

O teste de sensibilidade ao contraste de luminância com variação da frequência espacial foi utilizado no Laboratório para medir a capacidade de processamento espacial do sistema visual em função do contraste. O teste computadorizado do Laboratório é denominado Contrast Test (programa VSC Demonstration Program) e possibilita diferenciar perdas em frequências espaciais específicas. O pico da função de sensibilidade ao contraste (FSC) situa-se nas frequências espaciais médias.

A forma e os parâmetros críticos da FSC dependem de um número de fatores que incluem: a média de luminância da grade; o perfil da luminância das grades; o nível do desfoco do sistema óptico; a transparência dos meios ópticos. O monitor utilizado para geração dos estímulos foi o SONY FD Trinitron GDM-F500T9 de alta resolução (figura 10).

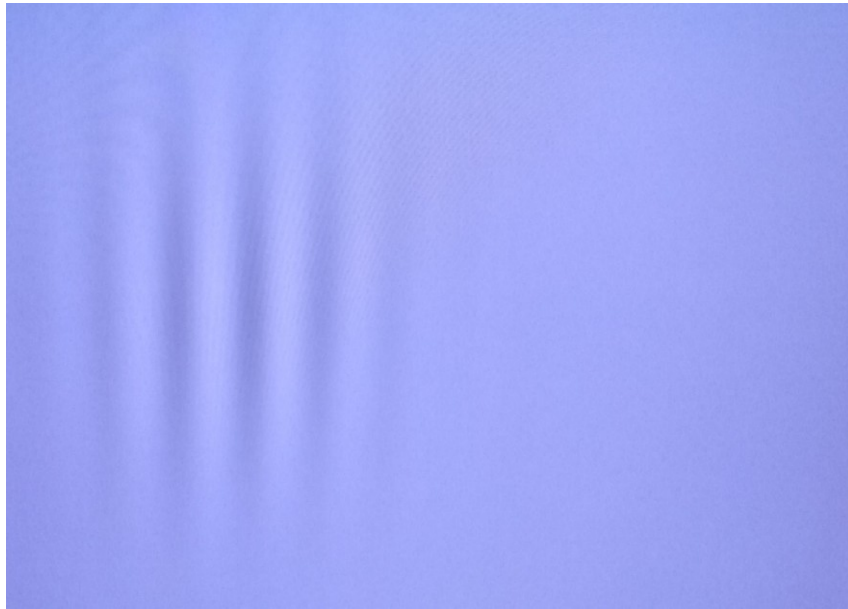


Figura 10. Exemplo de imagem no monitor apresentando o estímulo para o Contrast Test mostrando as grades no lado esquerdo na frequência espacial 2.0 cpg.

A função de sensibilidade ao contraste da luminância espacial foi obtida usando estímulos acromáticos estáticos (preto e branco). Os estímulos eram grades de onda senoidal com uma função de luminância Gabor com borda Gaussiana sobreposta para mascarar as bordas abruptas do estímulo. Seis frequências espaciais foram testadas: 0,8; 1,4; 2,0; 4,0; 10,0 e 16,0 ciclos por grau (cpg), com contraste inicial de 33%; cada acerto diminui em 0,9% o contraste e cada erro aumenta em 1,2% o contraste. São realizadas 8 reversões para a determinação do limiar. A duração média de aplicação do teste é de aproximadamente 30 minutos. É uma tarefa de fácil compreensão, entretanto pode ser tornar-se cansativa, devido ao tempo que é necessário para manter o foco atencional.

4.5.3. DISPOSITIVO PORTÁTIL - TABLET

No Laboratório da Visão do Instituto de Psicologia da USP foram desenvolvidos, recentemente dois novos testes psicofísicos adaptados ao tablet, para avaliar discriminação cromática e a sensibilidade ao contraste espacial de luminância, respectivamente Tablet Color Vision Test (Tablet CVT) e Tablet Contrast Sensitivity Test (Tablet CST). Antes da aplicação com o Tablet Color Vision Test nos pacientes realizou-se o CCT e o Tablet Color Test em grupo controle para verificar se os resultados eram similares. De mesma forma o Tablet Contrast Sensitivity foi realizado nos pacientes somente após aplicação do Contrast Test em um grupo controle no laboratório.

4.5.3.1. TESTES PSICOFÍSICOS NO TABLET

O Tablet CVT e o Tablet CST foram desenvolvidos em ambiente Android utilizando o software Android Studio (Licença Apache 2: software disponibilizado gratuitamente). Os aplicativos consideram a calibração do ecrã em termos da curva gama, relacionando as cores e a luminância com os valores digitais, os parâmetros temporais (frequência de apresentação das imagens) e espaciais (resolução e tamanho de pixel) para gerar os estímulos. Os aplicativos usam os parâmetros medidos para otimizar a apresentação dos estímulos. Após o desenvolvimento dos aplicativos, os programas foram instalados em dois dispositivos portáteis (Samsung Modelo Galaxy Tab S2).

A Figura 11 apresenta exemplos da tela do teste com os estímulos visuais utilizados no Tablet CVT (A) e no Tablet CST (B).

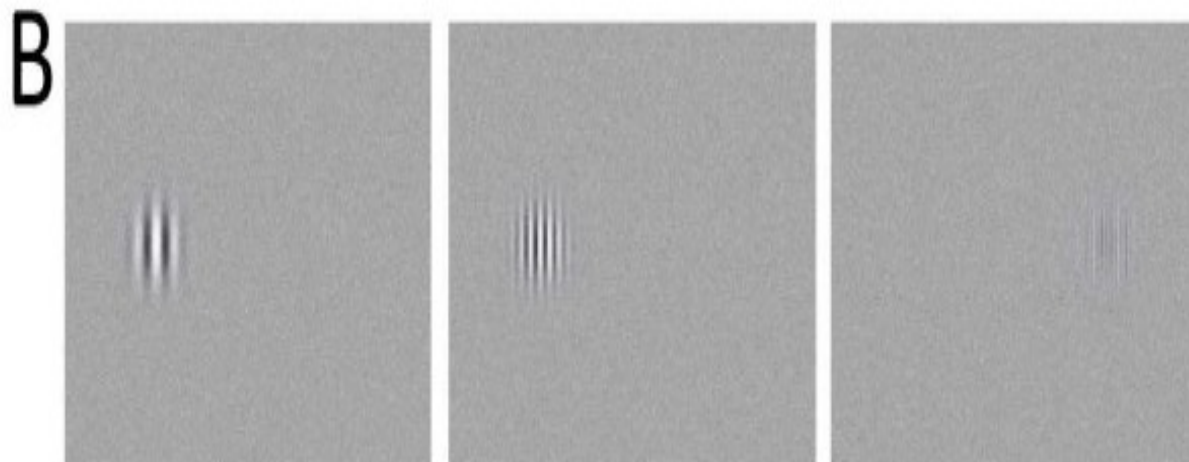
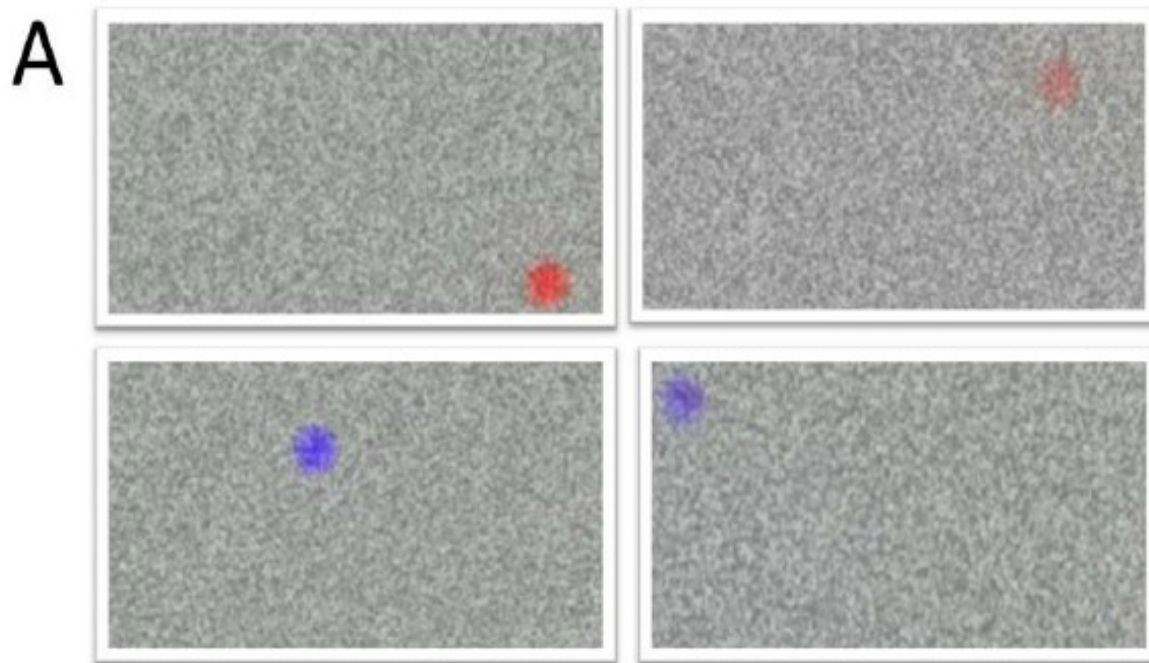


Figura 11. Exemplos das telas de exame do Tablet CVT (A) mostrando um estímulo cromático mais saturado (esquerda) e menos saturado (direita) para o protocolo protan (acima) e igualmente para o protocolo tritan (abaixo). Em B exemplos das grades acromáticas senoidais do CST para diferentes frequências espaciais.

4.5.3.2. TABLET COLOR TEST (TABLET CVT)

O teste de discriminação de cores foi desenvolvido com base em procedimentos clássicos bem estabelecidos (Mollon & Reffin 1989; Rodriguez-Carmona et al. 2005). Os estímulos visuais foram baseados na idéia dos testes de visão de cores pseudoisocromáticos em que são eliminadas diferenças de luminância ou bordas entre o alvo e o fundo para que a discriminação fosse dependente apenas da cromaticidade.

Os parâmetros do estímulo são: diâmetro 15mm, ângulo visual: fundo = $36^\circ \times 28^\circ$ (30 cm) e alvo = $2,8^\circ$ (30 cm). A velocidade de movimentação do alvo é de 3 mm/s e o fundo é formado por pontos com tamanho de 10x10 pixels e cromaticidade fixa ($x= 0.3159$, $y= 0.3353$; CIE 1931) e com luminância variável (115 ± 60 cd/m²) em apresentação dinâmica (10 HZ). Para a avaliação a tela do tablet (Galaxy Tab S2 8 "; Samsung, Seul, Coreia do Sul) era colocada a 30 cm do olho do observador.

Nesse teste o estímulo é apresentado dinamicamente, o que significa que o alvo cromático nunca permanece em um local específico da tela, mas em constante movimento na tela. As características da estimulação asseguram que o observador possa identificar o alvo apenas por discriminação cromática e não devido a pistas de contorno, diferenças de luminância ou processos visuais adaptativos. A tarefa do observador consiste em identificar a posição do alvo cromático dinâmico em um contexto de cromaticidade constante na tela de um tablet portátil (Galaxy Tab S2 8 "; Samsung, Seul, Coreia do Sul). A resposta é dada pelo observador usando o sistema de tela sensível ao toque do dispositivo portátil para apontar para a localização exata do alvo em movimento. Quando a resposta do observador está correta, a cromaticidade do alvo se aproxima em 10% da cromaticidade de fundo. No caso de resposta incorreta (ou ausência de resposta após 3 segundos), a cromaticidade do alvo é afastada 10% da cromaticidade do fundo, a cada 3 segundos, até poder ser identificado novamente pelo observador.

Para cada um dos três testes de discriminação de cores aplicados aqui, consecutivamente em ordem aleatória, os alvos diferem do fundo ao longo de uma linha significativa específica no espaço de cores: protan (sensibilidade do cone L), deutan (sensibilidade do cone M), ou tritan (sensibilidade do cone S). Após seis reversões do estímulo, o limiar é calculado. Os resultados são apresentados em coordenadas de

cromaticidade com base no diagrama de espaço de cores CIE 1976. O resultado é a distância entre a cromaticidade do limiar e a cromaticidade do fundo. Valores mais baixos correspondem a uma melhor discriminação de cores.

O Tablet CVT foi realizado com o participante posicionado na frente da tela com seus olhos à distância de 30 cm da tela do aparelho. O teste foi realizado numa sala escura, vedada à luz. Foi explicado aos participantes o funcionamento do teste. O participante devia tocar o lado em que o estímulo estivesse aparecendo e quando não soubesse identificar o lado deveria apertar qualquer um dos lados da tela do tablet (método de escolha Forçada – direita ou esquerda). Caso o participante se distraísse o teste era reiniciado e a explicação era repetida. A duração do teste foi de cerca de 10 minutos, incluindo as instruções.

4.5.3.3. TABLET CONTRAST SENSITIVITY (TABLET CST)

O novo teste de sensibilidade ao contraste espacial de luminância - Tablet CST foi criado utilizando grades senoidais verticais como estímulo. A grade senoidal é definida em termos de modulação da amplitude de contraste e da sua frequência espacial. É, portanto, um estímulo elementar cuja luminância varia de forma senoidal no espaço, numa direção, num sistema de coordenadas cartesianas (Santos & Simas, 2001). A tela do tablet (Galaxy Tab S2 8 "; Samsung, Seul, Coreia do Sul) é colocada a 30 cm do olho do observador.

A função de sensibilidade ao contraste da luminância espacial é obtida usando estímulos acromáticos estáticos (preto e branco). Os estímulos são grades senoidais sobrepostas a uma função Gabor com borda Gaussiana para "mascarar" a borda. Seis frequências espaciais podem ser testadas: 0,8; 1,4; 2,0; 4,0; 10,0 e 16,0 ciclos por grau (cpg). Para todas as frequências espaciais, o teste começa com um alto contraste de luminância (99%). A luminância média do estímulo (75 cd/m^2) é constante e idêntica à luminância média do fundo homogêneo cinza. Em cada apresentação de estímulo, o alvo aparece aleatoriamente no lado direito ou no lado esquerdo da tela. A resposta está correta quando o observador toca a tela do lado onde o estímulo apareceu. Se o observador tocasse o lado oposto, a resposta seria considerada incorreta.

A cada resposta correta, o contraste do estímulo diminui 5%, e o contraste do estímulo aumenta 6% a cada resposta incorreta. O objetivo do teste é determinar o menor contraste que o observador precisa para identificar o estímulo. O valor do limiar é calculado com base nas cinco últimas reversões do estímulo.

O contraste da luminância foi calculado usando a equação de Michelson $(I_{max} - I_{min}) / (I_{max} + I_{min})$, que considera a intensidade máxima (max) e mínima (min) de luminância (I) do alvo. A sensibilidade ao contraste, calculada como recíproca do limiar de contraste é plotada contra a respectiva frequência espacial. Quanto mais altos os valores da função, melhor a sensibilidade ao contraste.

Os testes foram realizados em sala escura. Foi explicado ao participante que o teste seria realizado seis vezes, para cada uma de seis frequências espaciais diferentes e que o participante deveria de apertar o lado (direito/esquerdo) em que visualizasse o estímulo (grades com faixas pretas e brancas). A duração do teste foi de cerca de 25 minutos no total, incluindo as instruções.

4.6. ANÁLISE DE DADOS

A análise dos dados apresenta estatística descritiva (média, desvio padrão e limites de normalidade). Inicialmente realizou-se o Test t para comparar os resultados do CCT e Tablet CVT assim como o Visage Contrast Teste e o Tablet CST nos participantes controles O teste estatístico de análise de variância (Anova) foi utilizado para verificar diferenças entre as idades do grupo controle e dos subgrupos: DMD 1, DMD 2, DMD 3, DMD 4 e BMD.

Ao final foi verificadas as diferenças estatísticas para todos os parâmetros utilizando o *Teste post hoc de Tukey* (Teste de comparação de médias), considerando como fator o grupo que representa ausência de alteração ou o tipo de alteração no gene DMD.

5. RESULTADOS

5.1. COMPARAÇÃO ENTRE CCT E TABLET CVT

Os resultados tratam da comparação entre o teste realizado no laboratório CCT e o Tablet CVT (tabela 2) para discriminação cromática nos mesmos sujeitos controles (n=27, idade média=23,1 ± 8,8 anos).

Tabela 2. Comparação entre médias no CCT e o Tablet CVT

EIXO	CCT (u'v' x 10 ⁴)	Tablet CVT (u'v' x 10 ⁴)
PROTAN	39,29 ± 15,30	38,23 ± 11,37
DEUTAN	39,62 ± 15,13	36,62 ± 12,57
TRITAN	57,37 ± 17,28	50,37 ± 20,37

Os resultados na tabela 2 demonstraram similaridades entre os resultados do CCT e do Tablet CVT nos três eixos de discriminação cromática, sem apresentar diferenças significativas (apêndice 1) nos resultados dos eixos protan (*teste t*: p=0,77), deutan (*teste t*: p=0,43) e tritan (*teste t*: p=0,18).

Calcularam-se também a mediana e os quartis de 25% e 75% (tabela 3) obtidos nos eixos protan, deutan e tritan para o mesmo grupo de sujeitos.

Tabela 3. Mediana e quartis no CCT e o Tablet CVT

	Protan	Deutan	Tritan
CCT	35 (29/ 45,5)*	35 (29/46)	54 (46,5/67,5)
Tablet CVT	36,96 (32,66/43,15)	33,9 (26,86/42,79)	48,67 (35,45/63,08)

* mediana (quartil 25%/quartil 75%)

Os valores encontrados de mediana, quartil 25% e quartil 75% (tabela 3) são bastante próximos, tanto no CCT como no Tablet CVT. Os resultados estão expressos na figura 12.

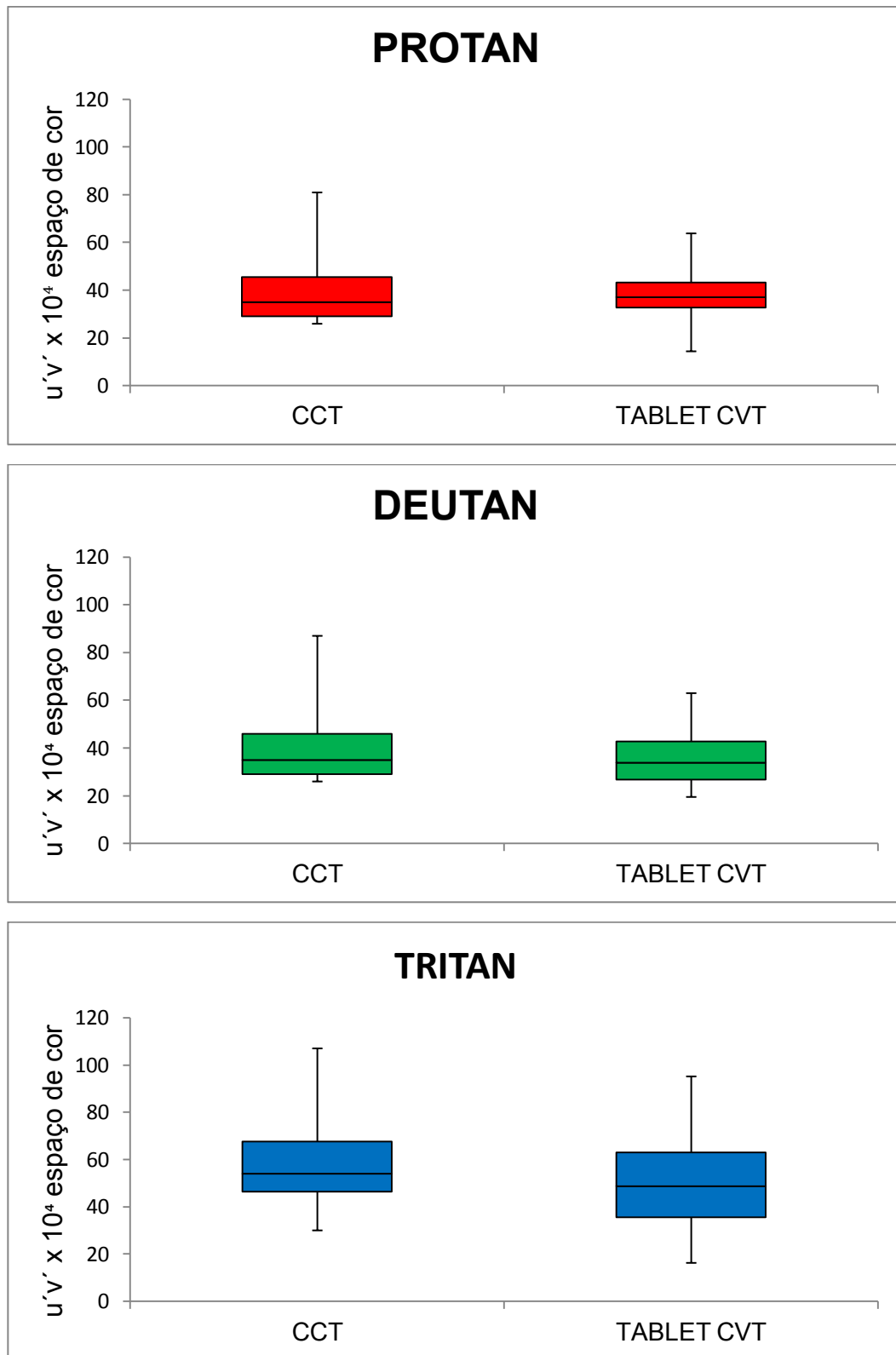


Figura 12. O gráfico ilustra os valores de mediana e quartis (25% e 75%) para os eixos protan (acima), deután (centro) e tritan (abaixo) Não houve diferenças estatísticas encontradas entre os testes realizados no CCT e no Tablet CVT.

A partir disso, o Tablet CVT passou a ser realizado nos pacientes com DMD e BMD fora do ambiente do laboratório.

5.2. COMPARAÇÃO ENTRE CONTRAST TEST E TABLET CST

A comparação de resultados entre o teste realizado no laboratório Contrast Test e Tablet CST para exame de sensibilidade ao contraste de luminância espacial nos mesmos sujeitos controles (n=21, idade média=26,1 ± 7,7 anos) é apresentada na Tabela 4.

Tabela 4. Comparação entre Contrast Test e Tablet CST

Frequência Espacial cpg	Contrast Test	Tablet CST
	Sensibilidade (log10)	Sensibilidade (log10)
0,8	1,79 ±0,25	1,85 ±0,28
1,4	1,92 ±0,15	1,53 ±0,19
2,0	2,02 ±0,29	1,51 ±0,22
4,0	2,19 ±0,23	1,21 ±0,15
10,0	1,81 ±0,33	0,65 ±0,21
16,0	1,33 ±0,41	0,33 ±0,12

A sensibilidade ao contraste espacial é em geral mais baixa para o Tablet CST, apresentando diferenças significativas (apêndice 1) na maioria as frequências espaciais: 0,8 cpg (teste t: p= 0,48) 1,4 cpg (teste t: p<0,01); 2,0 cpg (teste t: p<0,01); 4,0 cpg (teste t: p<0,01); 10,0 cpg (teste t: p<0,01); 16,0 cpg (teste t: p<0,01). Esta diferença de resultados ocorre possivelmente devido às diferenças técnicas dos diferentes displays, considerando que o método psicofísico utilizado é semelhante. Os resultados podem ser observados na figura 13.

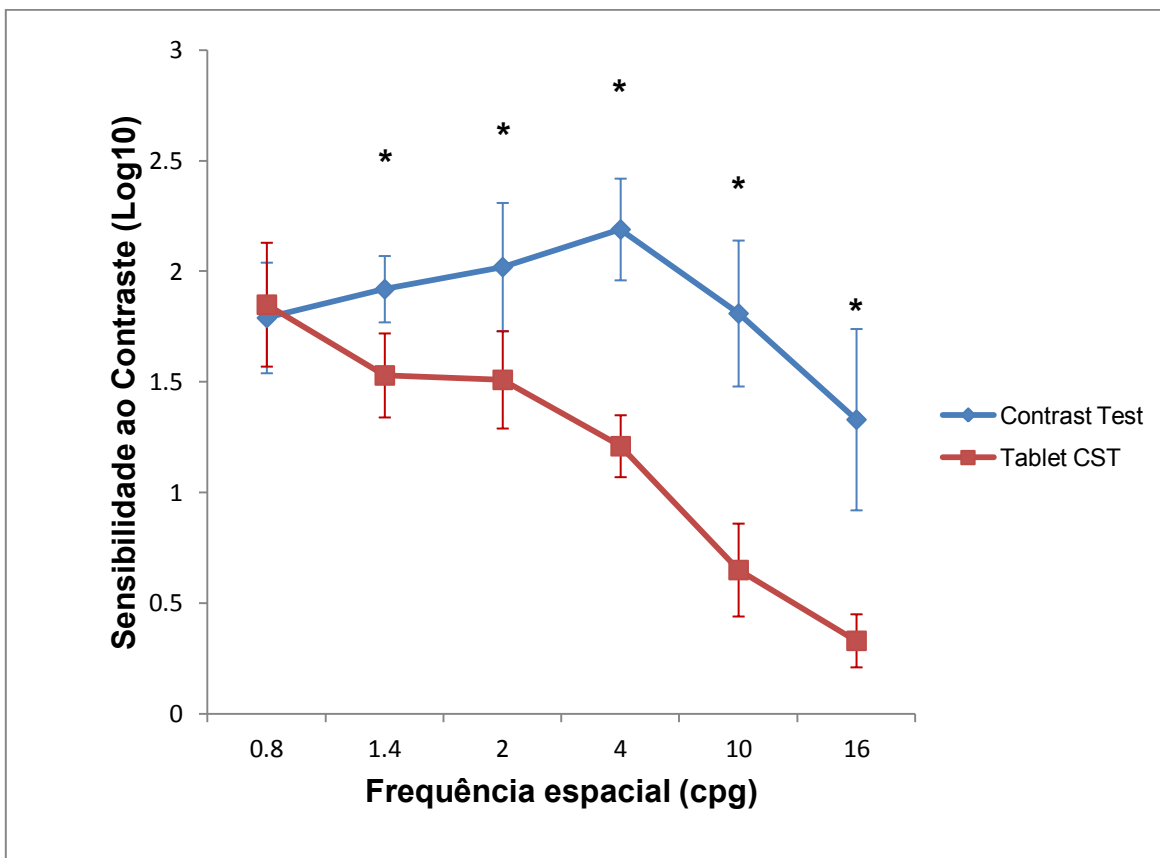


Figura 13. Resultados do exame de sensibilidade ao contraste espacial de luminância. O gráfico mostra a curva de sensibilidade ao contraste dos grupos avaliados no novo Tablet CST.

Após essa etapa a aplicação do Tablet CST passou a ser realizada nos pacientes com DMD e BMD.

5.3. RESULTADOS TABLET COLOR TEST (TABLET CVT)

Os dados de todos os participantes que realizaram o Tablet CVT estão na separados de acordo com as proteínas afetadas no gene *Dmd* (Tabela 5).

Tabela 5. Características dos grupos comparados no Tablet CVT

Grupo	N	Idade Média (anos)	Desvio Padrão (anos)	Genótipo	Proteínas afetadas
CTRL	41	15,4	6,1	-	-
BMD	10	26,9	11,9	Gene <i>Dmd</i>	Distrofinas
DMD 1	20	12,3	4,1	Exon 1 ao 29	Dp427
DMD 2	23	12,7	4,8	Exon 30 ao 44	Dp427 / Dp260
DMD 3	33	13,4	3,6	Exon 45 ao 62	Dp427 / Dp260 / Dp140
DMD 4	11	14,1	4,7	Exon 63 ao 79	Dp427 / Dp260 / Dp140/ Dp71

O grupo BMD apresenta maior média de idade e um número menor de participantes, até por ser uma patologia mais rara e branda da DMD. Também se pode notar que a média de idades do grupo CTRL, DMD1, DMD2, DMD3 e DMD4 encontram-se próximos e abaixo de 16 anos de idade. Não houve diferença de idade estatisticamente significativa entre os grupos CTRL e todos os subgrupos DMD (apêndice 5), entretanto houve diferença entre o grupo CTRL e o grupo BMD ($p < 0,01$).

Os resultados de mediana e dos quartis obtidos nos eixos protan, deutan e tritan para os quatro subgrupos de DMD, para o grupo BMD e para o grupo CTRL estão na tabela 6. Os limiares são expressos em unidades de u'v' do espaço de cor CIE 1976. Houve diferença estatisticamente significativa (apêndice 2) entre os grupos:

- CTRL e os grupos DMD 1 (teste de Tukey: $p < 0,01$), DMD 2 (teste de Tukey: $p < 0,05$), DMD 3 (teste de Tukey: $p < 0,05$), DMD 4 (teste de Tukey: $p < 0,01$) e BMD (teste de Tukey: $p < 0,05$) para o eixo protan;
- CTRL e os grupos DMD 1 (teste de Tukey: $p < 0,01$), DMD 2 (teste de Tukey: $p < 0,05$), DMD 3 (teste de Tukey: $p < 0,01$), DMD 4 (teste de Tukey: $p < 0,01$) e BMD (teste de Tukey: $p < 0,05$) para o eixo deutan;
- CTRL e os grupos DMD 1 (teste de Tukey: $p < 0,01$), DMD 2 (teste de Tukey: $p < 0,01$), DMD 3 (teste de Tukey: $p < 0,05$), DMD 4 (teste de Tukey: $p < 0,01$) e BMD (teste de Tukey: $p < 0,05$) para o eixo tritan;
- Não houve diferença estatística significativa entre os subgrupos DMD nos eixos protan, deutan e tritan.

Tabela 6. Resultados de mediana, quartis de 25% e 75% no Tablet CVT

	Protan (u'v'x 10⁴)	Deutan (u'v'x 10⁴)	Tritan (u'v'x 10⁴)
CTRL	40,45 (35,28/ 52,91)*	44,56 (34,25/ 58,39)	73,55 (46,81/ 84,57)
BMD	54,69 (47,52/ 61,44)	50,08 (46,06/ 67,50)	90,24 (78,14/ 104,31)
DMD 1	56,82 (46,93/ 64,93)	58,77 (42,86/ 92,70)	96,03 (83,53/ 106,21)
DMD 2	50,18 (40,04/ 66,18)	56,69 (48,37/ 70,00)	87,69 (70,09/ 102,00)
DMD 3	47,18 (42,9/ 66,77)	59,24 (45,91/ 77,05)	79,62 (61,76/ 99,18)
DMD 4	60,75 (53,23/ 84,44)	68,97 (54,26/ 82,31)	91,87 (86,02/ 99,01)

* mediana (quartil 25%/quartil 75%)

Os resultados observados na tabela 6 ilustram que os eixos protan, deután e tritan apresentaram valores de mediana superiores nos grupos BMD, DMD1, DMD2, DMD3 e DMD4 se comparados ao grupo controle. Os resultados também estão expressos na figura 14, com todos os grupos analisados.

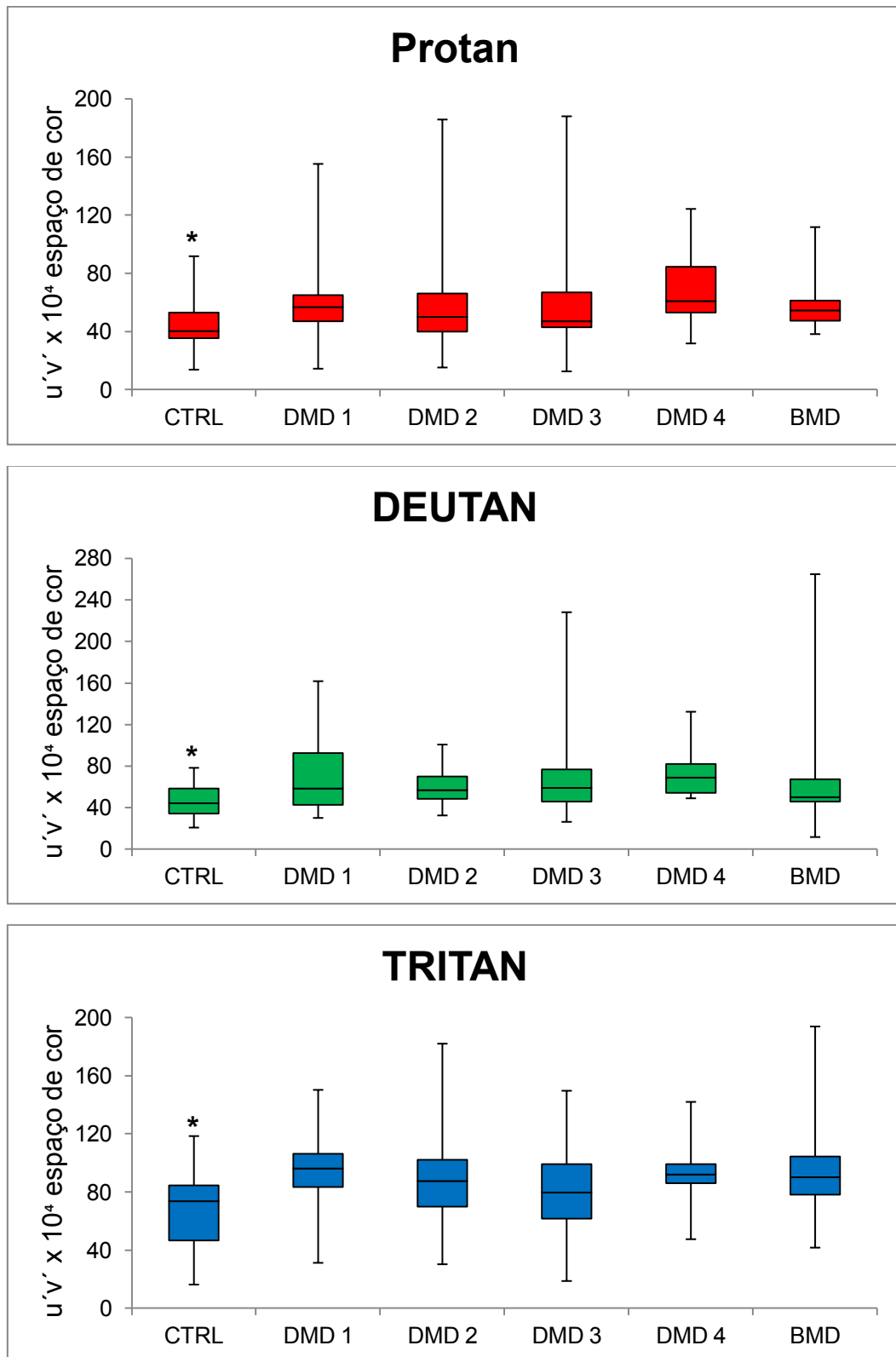


Figura 14. Mediana e quartis para os eixos protan (acima), deutan (centro) e tritan (abaixo) Diferenças estatísticas foram encontradas entre o grupo CTRL e todos os subgrupos DMD e no BMD.

Também foi realizada a divisão UPSTREAM ao exon 30 (exons localizados anteriormente ao exon 30 como referência) e DOWNSTREAM ao exon 30 (exons localizados após o exon 30 como referência) para comparação dos resultados em que a Dp260 está afetada (Tabela 7).

Tabela 7. Características dos grupos UPSTREAM 30 e DOWNSTREAM ao exon 30 no Tablet CVT

Grupo	N	Idade Média (anos)	Desvio Padrão (anos)	Genótipo
CTRL	41	15,7	6,1	-
UPSTREAM 30	20	12,2	4,1	Exon 1 ao 29
DOWNSTREAM 30	67	13,6	4,3	Exon 30 ao 79

O grupo DOWNSTREAM 30 tem um número de participantes maior de que o UPSTREAM 30, porém com pouca diferença na média de idades. Por sua vez, o grupo CTRL tem a média mais elevada nesta divisão (tabela 7).

Os resultados de mediana e dos quartis obtidos nos eixos protan, deutan e tritan para o grupo de DMD UPSTREAM 30, DMD DOWNSTREAM 30 e o grupo CTRL também foram comparados (tabela 8). Os limiares são expressos em unidades de u'v' do espaço de cor CIE 1976.

Houve diferença estatisticamente significativa (apêndice 2) entre os grupos CTRL e os grupos DMD UPSTREAM 30 e DMD DOWNSTREAM 30 (*teste de Tukey*: $p < 0,01$) para o eixo protan, assim como para o eixo deutan (*teste de Tukey*: $p < 0,01$) e para o eixo tritan (*teste de Tukey*: $p < 0,01$). Não houve diferença estatística significativa (apêndice 2) entre os subgrupos grupos DMD UPSTREAM 30 e DMD DOWNSTREAM 30 (*teste de Tukey*: $p = 0,5986$) para o eixo protan, assim como para o eixo deutan (*teste de Tukey*: $p = 0,5081$) e para o eixo tritan (*teste de Tukey*: $p = 0,5532$). Os resultados estão expressos na figura 15.

Tabela 8. Mediana e quartis no Tablet CVT subgrupos DMD UPSTREAM 30 e DMD DOWNSTREAM 30

	Protan (u'v'x 10⁴)	Deutan (u'v'x 10⁴)	Tritan(u'v'x 10⁴)
CTRL	40,45 (35,28/ 52,91)*	44,56 (34,25/ 58,39)	75,55 (46,81/ 84,57)
DMD UPSTREAM 30	56,82 (46,93/ 64,93)	58,77 (42,86/ 92,70)	96,03 (83,53/ 106,21)
DMD DOWNSTREAM 30	49,06 (42,81/73,14)	59,31 (49,25/77,92)	85,03 (66,83/101,25)

* mediana (quartil 25%/quartil 75%)

Os resultados observados na tabela 8 ilustram que os eixos protan, deutan e tritan apresentaram valores de mediana superiores nos grupos UPSTREAM 30 e DOWNSTREAM 30, comparados ao grupo controle.

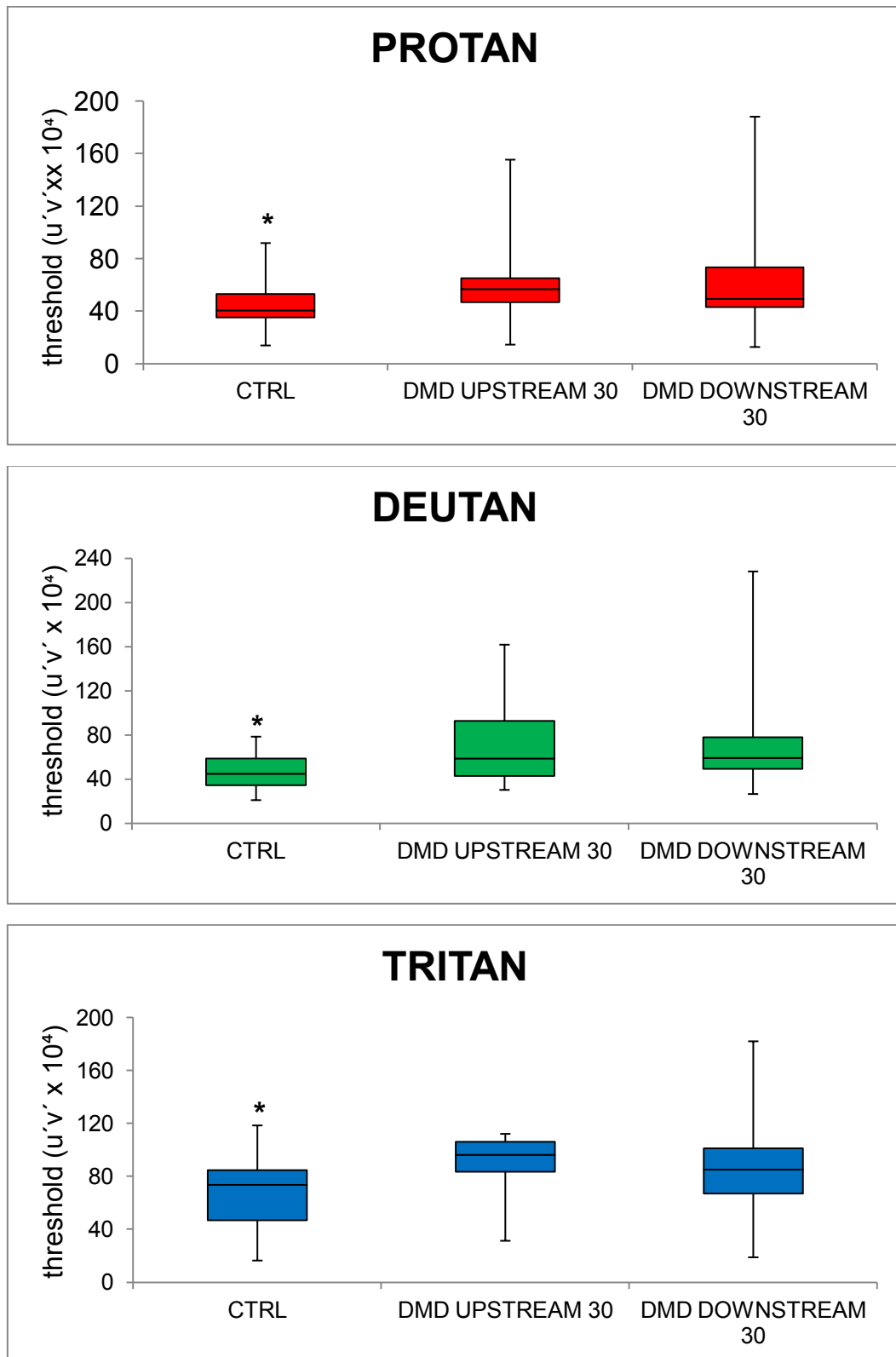


Figura 15. O gráfico ilustra os valores de mediana e quartis (25% e 75%) para os eixos protan (acima), deutran (centro) e tritan (abaixo). Diferenças estatísticas foram encontradas entre o grupo CTRL e o grupo DMD UPSTREAM ao Exon 30 e no DMD DOWNSTREAM ao Exon 30.

5.4. LIMITE SUPERIOR DE NORMALIDADE TABLET COLOR TEST

O limite superior (LS) de normalidade (Dixon & Massey, 1957) foi calculado para o grupo CTRL utilizando a fórmula $LS = \text{média} + 2(\text{desvio padrão})$. O LS de normalidade do grupo CTRL encontrado para os eixos de discriminação cromática foi: protan = $79 \text{ u'v' } \times 10^4$, deutan = $81 \text{ u'v' } \times 10^4$ e tritan = $123 \text{ u'v' } \times 10^4$. Os valores de LS de normalidade foram comparados com os subgrupos da DMD e BMD para verificar as alterações na discriminação cromática utilizando o Tablet CVT em todos os eixos (apêndice 3).

Foram encontrados resultados acima do LS de normalidade no grupo DMD 1 em 20% no eixo protan, 30% no eixo deutan e 10% no eixo tritan. No grupo DMD 2 em 22% protan, 17% deutan e 17% tritan. Para o grupo DMD 3 encontrou-se 15% protan, 18% deutan e 9% tritan acima do LS de normalidade. No último subgrupo DMD 4 os resultados foram de 27% protan, 27% deutan e 9% tritan acima do LS de normalidade comparado ao grupo CTRL. Por último o grupo BMD também apresentou valores acima de LS de normalidade - 20% para os eixos protan, deutan e tritan.

5.5. RESULTADOS TABLET CONTRAST SENSITIVITY

A avaliação de sensibilidade ao contraste espacial de luminância obtida com o Tablet CST foi realizada com um número menor de pacientes com DMD e BMD e CTRL, conforme a tabela 9.

A redução ocorreu devido à dificuldade tanto de pacientes como controles de manter a atenção durante toda a realização do teste (aproximadamente 25 minutos) para as seis frequências espaciais 0,8; 1,4; 2,0; 4,0; 10,0 e 16,0 cpg e também ao cansaço de muitos pacientes.

Tabela 9. Características dos grupos comparados Tablet CST

Grupo	N	Idade Média (anos)	Desvio Padrão (anos)	Genótipo	Proteínas afetadas
CTRL	35	22,8	9,1	-	-
BDM	7	21,7	9,7	Gene <i>Dmd</i>	Distrofinas
DMD 1	10	12,5	3,4	Exon 1 ao 29	Dp427
DMD 2	14	14,3	5,1	Exon 30 ao 44	Dp427 / Dp260

DMD 3	16	13,7	4,1	Exon 45 ao 62	Dp427 / Dp260 / Dp140
DMD 4	5	13,0	6,6	Exon 63 ao 79	Dp427 / Dp260 / Dp140/ Dp71

A tabela 9 mostra que todos os grupos sofreram reduções no número de participantes e, assim a média de idade também foi modificada. Os resultados de sensibilidade ao contraste encontram-se na tabela 10 para todas as frequências espaciais avaliadas.

Tabela 10. Sensibilidade ao contraste

Frequência	0,8 cpg		1,4 cpg		2,0 cpg		4,0 cpg		10,0 cpg		16,0 cpg	
	M*	Dp**	M	Dp	M	Dp	M	Dp	M	Dp	M	Dp
CTRL	1,84	0,19	1,53	0,11	1,49	0,18	1,26	0,33	0,65	0,30	0,33	0,11
BMD	1,63	0,25	1,44	0,13	1,48	0,12	1,06	0,18	0,45	0,12	0,27	0,13
DMD 1	1,45	0,22	1,50	0,18	1,26	0,18	1,05	0,24	0,41	0,31	0,41	0,42
DMD 2	1,32	0,28	1,32	0,26	1,31	0,22	0,97	0,23	0,30	0,16	0,16	0,06
DMD 3	1,35	0,67	1,17	0,59	1,31	0,33	1,00	0,38	0,29	0,14	0,16	0,13
DMD 4	1,31	0,40	1,26	0,21	1,09	0,17	0,87	0,17	0,46	0,38	0,18	0,12

*M = média em log10; **Dp = desvio padrão em log10

Para todos os grupos, em todas as frequências espaciais, exceto em 16,0 cpg no grupo DMD 1, os limiares dos DMD e BMD mostram valores reduzidos relativamente ao grupo CTRL na Tabela 10. A Figura 16 mostra que pacientes nos subgrupos DMD apresentam redução da função de sensibilidade ao contraste de luminância. Para as frequências espaciais 0,8 cpg, 2,0 cpg e 4,0 cpg houve redução estatisticamente significativa (*teste de Tukey*: $p < 0,05$) para todos os subgrupos DMD1, DMD2, DMD3 e DMD4 comparados ao grupo CTRL (apêndice 4). Não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre o grupo CTRL e o grupo BMD. Também não foram encontradas diferenças significativas entre os subgrupos DMD1, DMD2, DMD3 e DMD4 nas frequências espaciais 0,8 cpg, 1,4 cpg, 4,0 cpg, 10,0 cpg, 16,0 cpg. Todavia, encontrou-se diferença significativa (*teste de Tukey*: $p < 0,05$) entre os subgrupos DMD2 e DMD4 na frequência espacial 2,0 cpg.

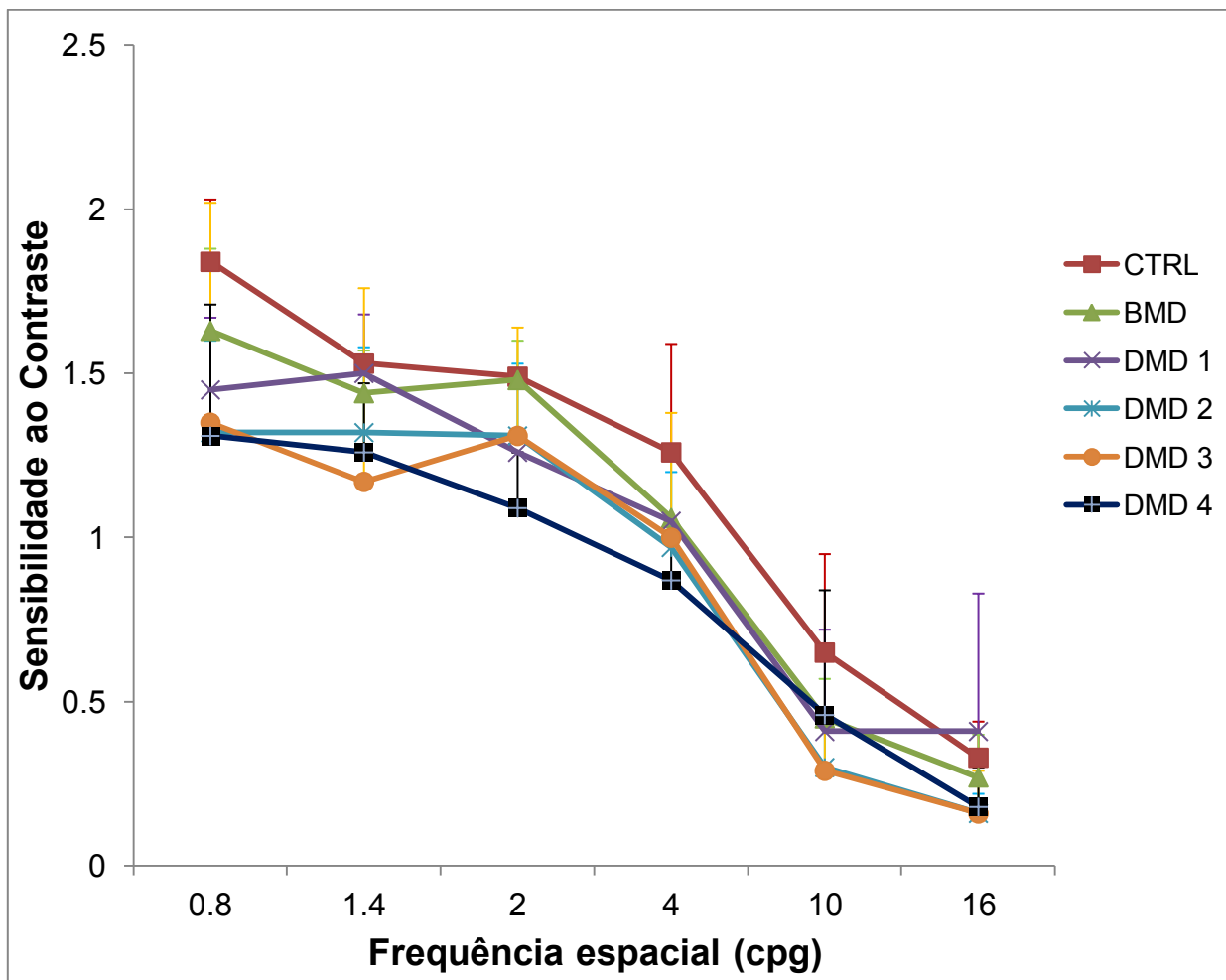


Figura 16. Resultados de sensibilidade ao contraste espacial de luminância. O gráfico mostra a curva de sensibilidade ao contraste dos grupos avaliados no Tablet CST.

Os resultados de sensibilidade ao contraste para o grupo de DMD UPSTREAM 30, DMD DOWNSTREAM 30 e o grupo CTRL também foram comparados (tabela 11).

Tabela 11. Características dos grupos DMD UPSTREAM 30 e DMD DOWNSTREAM

Grupo	N	Idade Média (anos)	Desvio Padrão (anos)	Genótipo	Proteínas afetadas
CTRL	35	22,8	9,1	-	-
DMD UPSTREAM 30	10	12,5	3,4	Exon 1 ao 29	Dp427
DMD DOWNSTREAM 30	35	16,6	5,3	Exon 30 ao 79	Dp427 / Dp260 / Dp140/ Dp71

Os resultados observados na tabela 11 ilustram que o grupo Upstream 30 tem um número menor de participantes e com menor idade média que o grupo CTRL e DOWNSTREAM 30.

Também se calculou a sensibilidade ao contraste média para as diferentes frequências espaciais avaliadas (tabela 12).

Tabela 12. Sensibilidade ao contraste dos grupos DMD UPSTREAM 30 e DMD DOWNSTREAM

Frequência	0,8 cpg		1,4 cpg		2,0 cpg		4,0 cpg		10,0 cpg		16,0 cpg	
	M*	Dp**	M	Dp	M	Dp	M	Dp	M	Dp	M	Dp
CTRL	1,84	0,19	1,53	0,11	1,49	0,18	1,26	0,33	0,65	0,30	0,33	0,11
DMD UPSTREAM 30	1,45	0,22	1,50	0,18	1,26	0,18	1,05	0,24	0,41	0,31	0,41	0,42
DMD DOWNSTREAM 30	1,33	0,45	1,25	0,35	1,24	0,24	0,95	0,26	0,35	0,23	0,17	0,10

*M = média em log10; **Dp = desvio padrão em log10

Os valores das médias de sensibilidade ao contraste do grupos DMD UPSTREAM 30 e DMD DOWNSTREAM 30 foram menores que os do grupo CTRL em todas as frequências testadas. A Figura 17 mostra que pacientes nos subgrupos DMD UPSTREAM 30 e DMD DOWNSTREAM 30 apresentam redução da função de sensibilidade ao contraste de luminância e para as frequências espaciais 0,8 cpg, 2,0 cpg, 4,0 cpg e 10,0 cpg a redução foi estatisticamente significativa (apêndice 4).

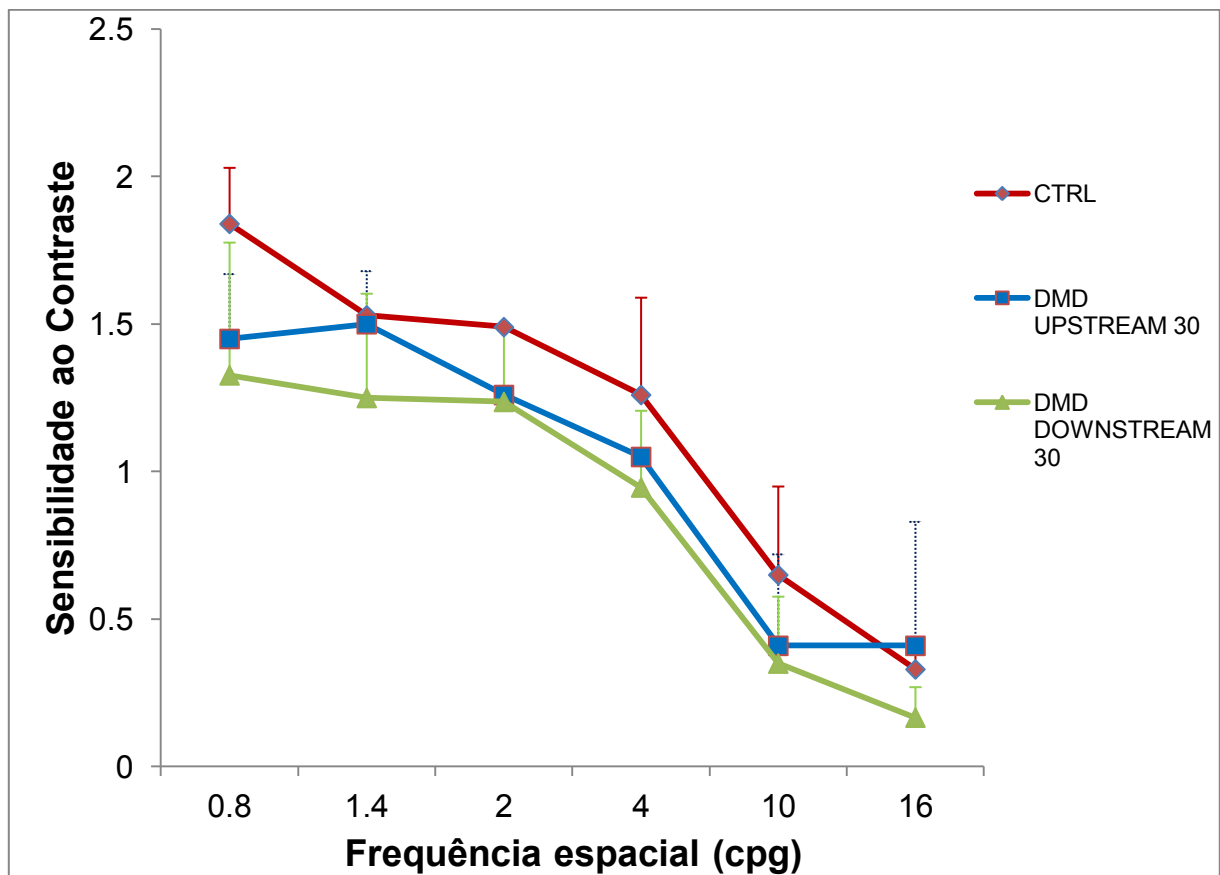


Figura 17. Resultados de sensibilidade ao contraste espacial de luminância. O gráfico mostra a curva de sensibilidade ao contraste dos grupos DMD UPSTREAM 30, DMD DOWNSTREAM 30 e o CTRL avaliados no Tablet CST.

Os resultados significantes mostram uma redução da sensibilidade ao contraste nos pacientes DMD UPSTREAM 30 e downstream 30 comparados com o grupo controle.

6. DISCUSSÃO

Os testes realizados no laboratório para avaliar a discriminação cromática de participantes controles com o CCT e o Tablet CVT mostraram que não houve diferenças estatísticas significantes na amostra, o que possibilitou realizar o Tablet CVT fora do ambiente do laboratório com maior segurança que os resultados em pacientes com DMD e BMD são confiáveis. Por sua vez, o Contrast Test e o Tablet CST para avaliação da sensibilidade ao contraste no laboratório verificou-se diferenças significativas, sendo os resultados do Tablet CST mais baixos que os verificados no Contrast Test, que possivelmente estão relacionadas com as diferenças técnicas dos diferentes displays, visto que o método psicofísico empregado foi similar.

Todavia, ambos os testes desenvolvidos para o tablet já foram utilizados em um estudo que avaliou os efeitos de terapêuticos de um treino por biofeedback em pacientes com perda da visão central devido à degeneração macular cujos resultados foram recentemente publicados (Barboni et al., 2018).

Foram encontradas diferenças estatísticas significantes no limiar de discriminação cromática para os eixos protan, deutan e tritan entre o grupo controle e todos os subgrupos DMD e BMD utilizando o Tablet CVT, o novo dispositivo portátil para a medição da discriminação de cores. Estes resultados contribuem para o melhor detalhamento da visão humana em relação aos diferentes subprodutos do gene *Dmd*, pois mecanismos visuais afetados parecem relacionar-se com grande variedade às proteínas (Dp427 / Dp260 / Dp140/ Dp71).

Ressalta-se que a retina é sítio de expressão de diversos produtos do gene *Dmd*. Os estudos em modelos animais mostram que pelo menos quatro tipos de proteínas são expressas na retina (até o momento somente a Dp116 não foi encontrada) e que possivelmente há diversas isoformas com junções (em inglês: splicings) em diferentes exons e que essas isoformas poderiam ter funções diferentes ou serem expressas em períodos distintos do desenvolvimento (Aragón et al., 2017).

As alterações retinianas encontradas em pacientes e em modelos animais no início da década de 1990 foram inicialmente associadas à disfunção na comunicação sináptica entre bastonetes e células bipolares, confirmando o envolvimento da Dp260 nessa transmissão. Atualmente sabe-se que a Dp260 não é a única responsável pelos

prejuízos retinianos, Dp427, Dp140, e Dp71 também são necessárias para a integridade da fisiologia da retina em humanos (Riccott et al., 2015).

A alteração retiniana não está apenas associada à disfunção da via dos bastonetes, mas a via dos cones também é afetada na DMD. Pelo menos em camundongos, e a Dp427 é mais expressa em cones do que em bastonetes (Wersinger et al., 2011). Possivelmente a Dp 427 estaria envolvida com uma alteração assimétrica da via ON dos cones (Barboni et al., 2013).

Isso poderia explicar porque prejuízos retinianos relacionados ao funcionamento dos cones são encontrados em pacientes com alterações upstream 30 (Barboni et al., 2016) no presente trabalho. Entretanto, somente pacientes com alteração da Dp260 apresentaram prejuízos na visão de cores e para o vermelho-verde em estudo anterior (Costa et al., 2007). A Dp260 é mais importante para a via dos bastonetes e a Dp427 para a via dos cones e a disfunção de ambas as proteínas deveria afetar de modo semelhante todos os cones.

A DMD causa prejuízos no sistema nervoso central como um todo e não somente na retina. Desse modo, não podemos concluir que os prejuízos psicofísicos são causados apenas pela alteração das distrofinas na retina, como mostrado com o ERG (Barboni et al., 2013).

A partir dos resultados do teste de Tukey evidencia-se que há diferenças significativas entre o grupo controle e os grupos DMD nos três eixos: protan, deutan, tritan, o que indica alterações na visão de cores independente do local de alteração genética no gene *Dmd*. Os resultados são semelhantes entre pacientes com DMD quando se separa a amostra em subgrupos de acordo com os locais de alteração genética. Entretanto, quando comparados com o grupo CTRL os pacientes com DMD apresentam perdas na visão de cores.

Os resultados mostraram que não há diferenças significantes entre as isoformas da distrofina em relação à discriminação cromática. Independentemente do local de alteração genética houve valores acima do limite superior de normalidade calculado, o que mostra perdas na visão de cores tanto em pacientes UPSTREAM ao exon 30 (apenas Dp427 afetada) como em pacientes DOWNSTREAM ao exon 30 (com participação da, Dp260, Dp140 e Dp71). Portanto, a alteração de proteínas distrofinas

tem impacto negativo na visão de pacientes com DMD e BMD. Além disso, verificou-se, que os subgrupos DMD e o grupo BMD apresentaram limiares que variam entre 10% a 30% acima do valor encontrado no grupo controle, sendo os maiores índices nos eixos protan e deutan, como encontrado no estudo de Costa et al (2007).

Em relação à BMD os resultados são similares ao encontrado em pacientes DMD, com diferenças significantes nos três eixos de discriminação cromática: protan, deutan e tritan. Os resultados mostram a existência de prejuízo na visão de cores

A sensibilidade ao contraste espacial mostrou resultados parecidos com o estudo de Costa et al. (2007a) em que a sensibilidade ao contraste espacial dos participantes com DMD era inferior à dos controles. Participantes com DMD necessitam de maiores níveis de contraste que controles para detectar a presença do estímulo em forma de grade espacial. Quando se comparam os subgrupos DMD 1, DMD 2, DMD 3 e DMD 4 não são encontradas diferenças significativas entre si, ou seja, os resultados são semelhantes. Os participantes com BMD não apresentaram alteração quando comparado ao grupo controle.

Ao se comparar os controles com os participantes agrupados em UPSTREAM ao exon 30 e DOWNSTREAM ao exon 30 houve diferença estatística significativa, o que corrobora o estudo anterior de Costa et al. (2007a), cujo grupo downstream 30 apresentou maior prejuízo na sensibilidade ao contraste espacial

Os resultados indicam que os participantes com DMD e BMD, comparados aos controles, apresentam prejuízo na discriminação de cores, enquanto somente os participantes com DMD apresentaram perdas na sensibilidade ao contraste espacial de luminância.

7. CONCLUSÕES

No presente trabalho verificou-se que há prejuízos na capacidade de discriminação cromática nos participantes com DMD e BMD nos eixos protan, deutan e tritan independentemente do local de alteração genética no gene DMD comparado ao grupo controle. Também verificou-se que há diferenças na sensibilidade ao contraste espacial de luminância entre os participantes com DMD e o grupo controle nas frequências menores de 0,8; 2,0 e 4,0 cpg.

Destaca-se que avaliação psicofísica da visão de cores e sensibilidade ao contraste foi realizada pela primeira vez em pacientes com DMD e BMD fora do laboratório, através do Tablet Color Test e Tablet Contrast Sensitivity, o que demonstra sua funcionalidade e praticidade para o avanço de pesquisas com essa e outras populações para além do realizados no laboratório da visão da USP.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, J. L., Head, S. I., Rae, C., & Morley, J. W. (2002). Brain function in Duchenne muscular dystrophy. *Brain*, 125, 4-13.
- Aragón, J., González-Reyes, M., Romo-Yáñez, J., Vacca, O., Aguilar-González, G., Rendón, A., ... Montañez, C. (2017). Dystrophin Dp71 Isoforms Are Differentially Expressed in the Mouse Brain and Retina: Report of New Alternative Splicing and a Novel Nomenclature for Dp71 Isoforms. *Molecular Neurobiology*, 55(2), 1376–1386.
- Bar, S., Barnea, E., Levy, Z., Neuman, S., Yaffe, D., & Nudel, U. (1990). A novel product of the Duchenne muscular dystrophy gene which greatly differs from the known isoforms in its structure and tissue distribution. *Biochemical Journal*, 272, 557-560.
- Barboni, M. T. S., Nagy, B. V., Moura, A. L. A., Damico, F. M., Costa, M. F., Kremers J., & Ventura, D. F. (2013). ON and OFF Electroretinography and Contrast Sensitivity in Duchenne Muscular Dystrophy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 54, 3203.
- Barboni, M. T. S., Martins, C. M. G., Nagy, B. V., Tsai, T., Damico, F. M., Costa, M. F., Pavanello, R. C. M., Lourenço, N. C. V., Cerqueira, A. M. P., Zatz, M., Kremers, J., & Ventura, D. F. (2016). Dystrophin Is Required for Proper Functioning of Luminance and Red–Green Cone Opponent Mechanisms in the Human Retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 57, 3582.
- Barboni, M. T. S., Récsán, Z., Szepessy, Z., Ecsedy, M., Nagy, B. V., Ventura, D. F., Nagy, Z. Z., Németh, J. (2018). Preliminary Findings on the Optimization of Visual Performance in Patients with Age-Related Macular Degeneration Using Biofeedback Training. *Applied Psychophysiology and Biofeedback*. 44:61–70.
- Barbujani, G., Russo, A., Danieli, G. A., Spiegler, A. W., Borkowska, J., & Petruszewicz, I. H. (1990). Segregation analysis of 1885 DMD families: significant departure from the expected proportion of sporadic cases. *Human Genetics*, 84, 522-526.
- Blake, D. J., & Kroger, S. (2000). The neurobiology of Duchenne muscular dystrophy: learning lessons from muscle. *Trends in NeuroSciences*, 23, 92-99.

- Blake, D. J., Weir, A., Newey, S. E., & Davies, K. E. (2002). Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiological Reviews*, 82, 291-329.
- Brown, P. K., & Wald, G. (1964). Visual pigments in single rods and cones of human retina – direct measurements reveals mechanisms of human night and color vision. *Science*, 144, 45-47.
- Bucher, F., Friedlander, M. S., Aguilar, E., Kurihara, T., Krohne, T. U., Usui, Y., & Friedlander, M. (2019). The long dystrophin gene product Dp427 modulates retinal function and vascular morphology in response to age and retinal ischemia. *Neurochemistry International*, 104489.
- Bushby, K., Finkel, R., Birnkrant, D. J., Case, L. E., Clemens, P. R., Cripe, L., Kaul, A., Kinnett, K., McDonald, C., Pandya, S., Poysky, J., Shapiro, F., Tomezsko, J., Constantin, C. (2010). Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: implementation of multidisciplinary care. *The Lancet Neurology*, 9(2), 177–189.
- Byers, T. J., Lidov, H. G. W., & Kunkel, L. M. (1993). An alternative dystrophin transcript specific to peripheral nerve. *Nature Genetics*, 4, 77-81.
- Cibis, G. W., Fitzgerald, K. M., Harris, D. J., Rothberg, P. G., & Rupani, M. (1993). The effects of dystrophin gene mutations on the ERG in mice and humans. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 34, 3646-3652.
- Cornsweet, T. M. (1970). *Visual Perception*. New York, NY, Academic Press.
- Costa, M. F., Gualtieri, M., Oliveira, A. G. F., Sadun, F., DeNegri, A. M., Berezovsky, A., Salomao, S. R., Carelli, V., Sadun, A. A., & Ventura, D. F. (2007a). Contrast sensitivity mediated by ON- and OFF-subsystems of the magno- and parvocellular pathways of asymptomatic carriers of 11778 LHON. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 48, 941.
- Costa, M. F., Oliveira, A. G. F., Feitosa-Santana, C., Zatz, M., & Ventura, D. F. (2007b). Red-green color vision impairment in Duchenne Muscular Dystrophy. *American Journal of Human Genetics*, 80, 1064-1075.

- Costa, M. F. (2011). Clinical psychophysical assessment of the ON- and OFF systems of the magnocellular and parvocellular visual pathways. *Neuroscience and Medicine*, 2, 330-340.
- Costa, M. F., Barboni, M. T. S., & Ventura, D. F. (2011). Psychophysical measurements of luminance and chromatic spatial and temporal contrast sensitivity in Duchenne muscular dystrophy. *Psychology & Neuroscience*, 4, 67-74.
- D'Souza, V. N., Nguyen, T. M., Morris, G. E., Karges, W., Pillers, D. A., & Ray, P. N. (1995). A novel dystrophin isoform is required for normal retinal electrophysiology. *Human Molecular Genetics*, 4, 837-842.
- Dacey, D. M., Liao, H. W., Peterson, B. B., Robinson, F. R., Smith, V. C., Pokorny, J., Yau, K. W., & Gamlin, P. D. (2005). Melanopsin-expressing ganglion cells in primate retina signal colour and irradiance and project to the LGN. *Nature*, 433, 749-754.
- Davson, H. (1980). Retinal structure and organization. In H. Davson (Ed.), *Physiology of the eye* (4th ed., pp. 167-177). New York: Churchill Livingstone.
- Dawson, W. W., Trick, G. L., & Litzkow, C. A. (1979). Improved electrode for electroretinography. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 18, 988-991.
- DeBecker, I., Riddell, D. C., Dooley, J. M., & Tremblay, F. (1994). Correlation between electroretinogram findings and molecular analysis in the Duchenne muscular dystrophy phenotype. *British Journal of Ophthalmology*, 78, 719-722.
- Drenckhahn, D., Holbach, M., Ness, W., Schmitz, F., & Anderson, L. V. B. (1996). Dystrophin and the dystrophin-associated glycoprotein, betadystroglycan, co-localize in photoreceptor synaptic complexes of the human retina. *Neuroscience*, 73, 605-612.
- Diament, A., Cypel, S. (1998). *Neurologia infantil*. 3ªed. São Paulo, Atheneu.
- Dixon, W. J., Massey, F. J. (1957). *Introduction to statistical analysis*. 2ªedição. New York, McGraw-Hill Book Company, INC.
- Emery, A. E. H. (1966). Genetic linkage between the loci for colour blindness and Duchenne type muscular dystrophy. *Journal of Medical Genetics*, 3, 92-95.
- Emery, A. E. H. (2001). Muscular dystrophy - an evolving concept. In A. E. H. Emery (Ed.). *The muscular dystrophies* (pp. 1-9). New York: Oxford University Press.

- Essex, C., & Roper, H. (2001). Lesson of the week: late diagnosis of Duchenne's muscular dystrophy presenting as global developmental delay. *British Medical Journal*, 323, 37-38.
- Fitzgerald, K. M., Cibis, G. W., Giambone, S. A., & Harris, D. J. (1994). Retinal signal transmission in Duchenne muscular-dystrophy - evidence for dysfunction in the photoreceptor/depolarizing bipolar cell pathway. *The Journal of Clinical Investigation*, 93, 2425-2430.
- Fortina, P., Cheng, J., Shoffner, M. A., Surrey, S., Hitchcock, W. M., Kricka, L. J., & Wilding, P. (1997). Diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy and quantitative identification of carrier status by use of entangled solution capillary electrophoresis. *Clinical Chemistry*, 43, 745-751.
- Frishman, L.J. (2006). Origins of the electroretinogram. In Heckenlively, J.R. & Arden, G.B. (Eds.). *Principles and practice of clinical electrophysiology of vision*, 2nd edition (pp. 139-183).
- Girlanda, P., Quartarone, A., Buceti, R., Sinicropi, S., Macaione, V., Saad, F. A., Messina, L., Danieli, G. A., Ferreri, G., & Vita, G. (1997). Extra-muscle involvement in dystrophinopathies: an electroretinography and evoked potential study. *Journal of the Neurological Sciences*, 146, 127-132.
- Gilberto, F., Ferreiro, V., Dalamon, V., & Szijan, I. (2004). Dystrophin deletions and cognitive impairment in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Neurological Research*, 26, 83-87.
- Hauser, M. A., & Chamberlain, J. S. (1996). Progress towards gene therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Endocrinology*, 149, 373-378.
- Hoffman, E. P., Brown, R. H., Jr., & Kunkel, L. M. (1987). Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*, 51, 919- 928.
- Hoffman, E. P., Fischbeck, K. H., Brown, R. H., Johnson, M., Medori, R., Loike, J. D., Harris, J. B., Waterston, R., Brooke, M., Specht, L., et al. (1988). Characterization of dystrophin in muscle-biopsy specimens from patients with Duchennes or Beckers muscular-dystrophy. *New England Journal of Medicine*, 318, 1363-1368.

- Kennedy, J. D., Staples, A. J., Brook, P. D., Parsons, D. W., Sutherland, A. D., Martin, A. J., Stem, L. M., Foster, B. K. (1995). Effect of spinal surgery on lung function in Duchenne muscular dystrophy. *Thorax*, 50(11), 1173–1178.
- Kolb, H. (2003). How the retina works. *American Scientist*, 91, 28-35.
- Koenig, M., Hoffman, E. P., Bertelson, C. J., Monaco, A. P., Feener, C., & Kunkel, L. M. (1987). Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell*, 50, 509-517.
- Kremers, J., Lee, B. B., Pokorny, J., & Smith, V. C. (1993). Responses of macaque ganglion cells and human observers to compound periodic waveforms. *Vision Research*, 33, 1997-2011.
- Jung, D., Filliol, D., Metz-Boutigue, M.-H., & Rendon, A. (1993). Characterization and subcellular localization of the dystrophin-protein 71 (Dp71) from brain. *Neuromuscular Disorders*, 3(5-6), 515–518.
- Marmor, M. F., Holder, G. E., Seeliger, M. W., & Yamamoto, S. (2004). Standard for clinical electrophysiology. *Documenta Ophthalmologica*, 108, 107-114.
- Marmor, M. F., Fulton, A. B., Holder, G. E., Miyake, Y., Brigell, M., & Bach, M. (2009). ISCEV standard for full-field clinical electroretinography. *Documenta Ophthalmologica*, 118, 69-77.
- Mehler, M. F. (2000). Brain dystrophin, neurogenetics and mental retardation. *Brain Research Reviews*, 32, 277-307.
- Mollon, J. D., & Reffin, J. P. (1989). A computer-controlled colour vision test that combines the principles of Chibret and of Stilling. *Proceedings of the Physiological Society*, vol. 414.
- Moura, M. C. D. S. (2009). Alterações atencionais na Distrofia Muscular de Duchenne. Dissertação de Mestrado, Instituto de Psicologia - USP.
- Muntoni, F., Torelli, S., & Ferlini, A. (2003). Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurology*, 2, 731- 740.
- Nathans, J., Thomas, D., & Hogness, D. S. (1986). Molecular genetics of human color vision: The genes encoding blue, green and red pigments. *Science*, 232, 193-202.

- Nobile, C., Marchi, J., Nigro, V., Roberts, R. G., & Danieli, G. A. (1997). Exonintron organization of the human dystrophin gene. *Genomics*, 45, 421-424.
- O'Brien, K. F., & Kunkel, L. M. (2001). Dystrophin and muscular dystrophy: Past, present, and future. *Molecular Genetics and Metabolism*, 74, 75-88.
- Oliveira, P. (2002). Distrofia muscular de Duchene. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa.
- Online Mendelian Inheritance in Man. Gene description: 300377.DYSTROPHIN; DMD. <https://www.omim.org/entry/300377> acesso em 09 de outubro 2019.
- Pascual-Pascual, S. I., Molano, J., & Pascual-Castroviejo, I. (1998). Electroretinogram in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Pediatric Neurology*, 18, 315-320.
- Parsons, J. H. (1931). Theory of colour vision. Nature publishing group, n.3220, vol.128, p.123.
- Perlman, I. (1995). The electroretinogram: ERG. In: H. Kolb, E. Fernandez, & R. Nelson (Eds). *Webvision: the organization of the retina and visual system*. Lake City, UT: University of Utah Health Sciences Center.
- Philip, U., Walton, J. N., & Smith, C. A. B. (1956). Colour blindness and Duchenne type muscular dystrophy. *Annual Human Genetics*, 21, 155-158.
- Pillers, D. A. M., Bulman, D. E., Weleber, R. G., Sigesmund, D. A., Musarella, M. A., Powell, B. R., Murphey, W. H., Westall, C., Panton, C., Becker, L. E. et al. (1993). Dystrophin expression in the human retina is required for normal function as defined by electroretinography. *Nature genetics*, 4, 82- 86.
- Pillers, D. A. M., Weleber, R. G., Woodward, W. R., Green, D. G., Chapman, V. M., & Ray, P. N. (1995). Mdx(Cv3) mouse is a model for electroretinography of Duchenne-Becker muscular-dystrophy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 36, 462-466.
- Pillers, D. A. M. (1999). Dystrophin and the retina. *Molecular Genetics and Metabolism*, 68, 304–309.
- Rapaport, D., Fuchs, O., Nudel, U. & Yaffe, D. (1993). Expression of the Duchenne Muscular Dystrophy Gene Products in Embryonic Stem Cells and Their Differentiated Derivatives. *The journal of biological chemistry*, vol.267, n.30.

- Rapaport, D., Greenberg, D. S., Tal, M., Yaffe, D., & Nudel, U. (1993). Dp71, the nonmuscle product of the Duchenne muscular dystrophy gene is associated with the cell membrane. *FEBS Letters*, 328(1-2), 197–202.
- Ricotti, V., Jäggle, H., Theodorou, M., Moore, A. T., Muntoni, F., & Thompson, D. A. (2015). Ocular and neurodevelopmental features of Duchenne muscular dystrophy: a signature of dystrophin function in the central nervous system. *European Journal of Human Genetics*, 24(4), 562–568.
- Rodieck, R. W. (1998). *The first steps in seeing*. Sunderland: Sinauer Associates.
- Rodriguez-Carmona, M. L., Harlow, J. A., Walker, G., & Barbur, J. L. (2005). The variability of normal trichromatic vision and the establishment of the “normal” range. *Proceedings of 10th Congress of the International Colour Association*. Granada (pp. 979–982).
- Santos, N. A., & Simas, M. L. B. (2001). Função da Sensibilidade ao Contraste: Indicador da Percepção Visual da Forma e da Resolução Espacial. *Psicologia: Reflexão e Crítica*, volume 14, n.º 3.
- Schwartz, S. H. (2009). *Visual Perception: a clinical orientation*. State College of Optometry, State University of New York, New York.
- Schmitz, F., & Drenckhahn, D. (1997). Dystrophin in the retina. *Progress in Neurobiology*, 53, 547-560.
- Sigesmund, D. A., Weleber, R. G., Pillers, D. A. M., Westall, C. A., Panton, C. M., Powell, B. R., Héon, E., Murphey, W. H., Musarella, M. A., & Ray, P. N. (1994). Characterization of the ocular phenotype of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Ophthalmology*, 101, 856-865.
- Sitnik, R., Campiotto, S., Vainzof, M., Pavanello, R. C., Takata, R. I., Zatz, M., & Passos-Bueno, M. R. (1997). Novel point mutations in the dystrophin gene. *Human Mutation*, 10, 217-222.
- Tsai, T. I., Barboni, M. T. S., Nagy, B. V., Roux, M. J., Rendon, A., Ventura, D. F., & Kremers, J. (2016). Asymmetrical Functional Deficits of ON and OFF Retinal Processing in the mdx3Cv Mouse Model of Duchenne Muscular Dystrophy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 57(13), 5788.

- Verbovaia, L. V. & Razin, S. V. (1997). Mapping of replication origins and termination sites in the Duchenne muscular dystrophy gene. *Genomics*, 45, 24-30.
- Yaffe, D.; Makover, A.; Lederfein, D.; Rapaport, D.; Bar, S.; Barnea, E.; Nudel, U. (1992). Multiple products of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Symp soc exp boil.* 46:179-88.
- Yamamoto, T., Awano, H., Zhang, Z., Sakuma, M., Kitaaki, S., Matsumoto, M., Nagai, M., Sato, I., Imanishi, T., Hayashi, N., Matsuo, M., Iijima, K., Saegusa, J. (2018). Cardiac Dysfunction in Duchenne Muscular Dystrophy Is Less Frequent in Patients With Mutations in the Dystrophin Dp116 Coding Region Than in Other Regions. *Circulation: Genomic and Precision Medicine*, 11(1).
- Wersinger, E., Bordais, A., Schwab, Y., Sene, A., Bénard, R., Alunni, V., Alunni, V., Sahel, J.A., Rendon, A., Roux, M. J. (2011). Reevaluation of Dystrophin Localization in the Mouse Retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52(11), 7901.
- Zatz, M., Lange, K., & Spence, M. A. (1977). Frequency of Duchenne muscular dystrophy carriers. *Lancet*, 1, 759.
- Zatz, M., Vianna-Morgante, A. M., Campos, P., & Diament, A. J. (1981). Translocation (X;6) in a female with Duchenne muscular dystrophy: implications for the localisation of the DMD locus. *Journal of Medical Genetics*, 18, 442-447.

9. ANEXOS

9.1. APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Impacto de diferentes tipos de alteração do gene da distrofina na visão de pacientes com distrofia muscular

Pesquisador: LEONARDO APARECIDO SILVA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 80512617.6.0000.5561

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

Patrocinador Principal: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.606.745

Apresentação do Projeto:

Este estudo assinala que contribuirá para o avanço na compreensão dos aspectos funcionais do processamento visual em pacientes com alterações no gene dmd, pela utilização de novas tecnologias de investigação clínica não invasiva (novos protocolos de estimulação visual e um sistema portátil de dispositivos eletrônicos modernos) para avaliar a visão de pacientes com Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) e Distrofia Muscular de Becker (DMB). Mesmo com avanços nas pesquisas sobre o papel dos subgrupos do gene dmd no funcionamento retiniano, não está estabelecido ainda quais proteínas são responsáveis pelas mudanças no funcionamento do sistema visual de pacientes com DMD e DMB. É preciso entender melhor a relação entre alterações genéticas e alterações na percepção visual causadas pela DMD e pela DMB, estabelecendo uma relação genótipo-fenótipo visual. Será examinado o desempenho cognitivo dos participantes, com escalas WISC (6 a 16 anos) e WAIS (acima de 16 anos), pois esta função pode estar afetada na DMD e sua integridade é necessária para a execução dos testes visuais que dependem de compreensão de instruções verbais dadas pelo examinador.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar as alterações no funcionamento visual decorrentes de mutações no gene dmd, através de testes eletrofisiológicos de avaliação visual, em pacientes com Distrofia Muscular de Duchenne

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: cep.h.ip@usp.br

Continuação do Parecer: 2.606.745

(DMD n30) e em pacientes com Distrofia Muscular de Becker(DMB n15). Os resultados serão comparados com o de voluntários saudáveis(n30).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O pesquisador afirma que "os exames não oferecem riscos de dano físico e/ou psicológico ao participante". Razão provável para que não ofereça assistência ou seguimento individual em caso de eventual dano, centrando-se nos benefícios gerais e possíveis a serem obtidos com o estudo: entender como enxergam os pacientes com DMB e DMB; conhecer em detalhes as alterações visuais causadas por mutações no gene dmd; e futuramente, avaliar o impacto de intervenções terapêuticas para tratamento da DMD no sistema visual.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto mostra-se bem delineado, embasado em pesquisas de outros autores nacionais e internacionais de renome científico na área e apoiado em ampla experiência do grupo de pesquisa do IP, no qual o pesquisador está inserido.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos são adequadamente apresentados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências foram todas acatadas, os documentos foram reformulados (TALE e TCLE), com linguagem adequada, e foi incluído na equipe, além do orientador, o prof.Dr. Francisco Max Damico (CRM 79.563), <http://lattes.cnpq.br/7116274617422206>, Docente Pleno do Curso de Pós-Graduação em Oftalmologia da Faculdade de Medicina da USP e Médico Oftalmologista. Projeto 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

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

Continuação do Parecer: 2.606.745

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_DO_PROJETO_996880.pdf	04/02/2018 23:07:43		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_novo.pdf	04/02/2018 23:03:59	LEONARDO APARECIDO SILVA	Aceito
Outros	Carta_sumariada_ao_CEPH.pdf	04/02/2018 22:39:51	LEONARDO APARECIDO SILVA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_novo.pdf	04/02/2018 22:33:57	LEONARDO APARECIDO SILVA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	cartanuencia.pdf	21/11/2017 16:23:18	LEONARDO APARECIDO SILVA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declarcompromisso.pdf	21/11/2017 16:21:08	LEONARDO APARECIDO SILVA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declarinfraestrutura.pdf	21/11/2017 16:19:39	LEONARDO APARECIDO SILVA	Aceito
Folha de Rosto	folharosto.pdf	21/11/2017 16:18:04	LEONARDO APARECIDO SILVA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_mestrado_comite_etica.pdf	13/10/2017 21:37:11	LEONARDO APARECIDO SILVA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

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: 2.606.745

SAO PAULO, 18 de Abril de 2018

Assinado por:
Helena Rinaldi Rosa
(Coordenador)

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 04 de 04

9.2. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo

Departamento de Psicologia Experimental - Laboratório da Visão

Título da pesquisa: Impacto de diferentes tipos de alteração do gene da distrofina na visão de pacientes com distrofia muscular

Pesquisadores: Leonardo Aparecido Silva (pesquisador responsável pelo projeto), Dra. Dora Fix Ventura (Professora Titular coordenadora do projeto), Dra. Mirella Telles Salgueiro Barboni (pesquisadora associada ao projeto), Dr. Balazs Vince Nagy (pesquisador associado ao projeto), Dr. Francisco Max Damico (pesquisador associado ao projeto), Dr. Marcelo Fernandes da Costa (pesquisador associado ao projeto) e Sarah Leonardo Dias (pesquisadora associada ao projeto).

Seu filho (a) está sendo convidado (a) para participar, como voluntário, de um estudo desenvolvido no Laboratório da Visão do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo (USP). O estudo tem o objetivo de verificar e avaliar possíveis alterações visuais causadas pela Distrofia Muscular de Duchenne e Becker. A avaliação, baseada nos resultados dos exames, será realizada utilizando testes eletrofisiológicos - Eletroretinograma (ERG) e Potencial Visual Evocado (PVE) e testes psicofísicos (discriminação de cores e sensibilidade ao contraste). Durante o ERG e o PVE, que serão aplicados ao mesmo tempo, seu filho (a) ficará confortavelmente sentado para observar luzes piscando em um estimulador posicionado como se fosse um óculos. As luzes têm a função de estimular o sistema visual e verificar o seu funcionamento. Se necessário, um colírio será pingado para dilatação da pupila. As respostas serão captadas por um eletrodo colocado na parte inferior do olho, centro da testa, região central da cabeça e outro na região do lobo occipital.

Nos exames psicofísicos algumas imagens às vezes coloridas (para avaliar a discriminação cromática) e às vezes preta e branca (para avaliar a sensibilidade ao contraste) serão apresentadas na tela de um dispositivo portátil (tablet) em uma sala escurecida. Seu filho (a) ficará confortavelmente sentado e será orientado a responder, verbalmente ou tocando a tela do dispositivo, quando perceber a imagem e a localização da mesma. Por fim, será realizado o exame de adaptação ao escuro que necessita a estimulação com uma luz branca de alta intensidade e posterior apresentação de luzes pequenas verdes ou vermelhas. Um botão de respostas deverá ser acionado quando a luz for percebida. No meio do exame ocorrerá uma adaptação ao escuro de cinco minutos. Nesse período seu filho (a) poderá descansar, inclusive fechando os olhos, se preferir.

Os testes oferecem pequenos riscos de dano físico e/ou psicológico ao participante. É possível que seu filho (a) sinta um pouco de desconforto na colocação dos eletrodos e na aplicação do colírio, caso seja necessário. A adaptação ao escuro por cinco minutos também pode causar desconforto psicológico. Entretanto, é importante salientar que a pesquisa é conduzida por profissionais (de psicologia e medicina), que poderão cuidar do seu filho (a) caso tenha algum dano físico e/ou psicológico. Os exames poderão ser realizados no mesmo dia ou em dias diferentes com sessões mais curtas.

O estudo justifica-se porque na Distrofia Muscular de Duchenne pode ocorrer redução da atividade de vias que dependem da proteína envolvida na doença (distrofina), por esse motivo justifica-se pesquisar e estudar possíveis alterações em funções visuais que podem estar associadas a essa proteína.

Os dados serão sigilosos e os nomes dos participantes não serão divulgados. Também será avaliado o quociente de inteligência do participante através de um instrumento de avaliação da capacidade intelectual geral, a escala Wechsler de inteligência para crianças (WISC) para participantes de 6 a 16 anos e para adultos (WAIS) para participantes acima de 16 anos, que será aplicada para estabelecer o quociente de inteligência (QI). Sendo responsável pelo voluntário para este estudo:

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

A participação no estudo do seu filho (a) é totalmente voluntária. Você terá a liberdade de recusar a participação do seu filho (a) na pesquisa ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer penalização ou prejuízo. Os resultados serão sigilosos e o nome do seu filho (a) não será divulgado. Apenas os dados dos resultados dos exames poderão ser divulgados em publicações científicas. Você poderá tomar conhecimento dos resultados obtidos ao final da pesquisa, se desejar. Será fornecido o relatório do exame com as necessárias orientações médicas.

Você pode esclarecer suas dúvidas sobre qualquer aspecto deste estudo bem como retirar a autorização de seu filho (a) participar a qualquer momento em que desejar. A participação no exame é totalmente voluntária. Sua assinatura neste termo de consentimento indica que você autoriza filmagens durante os testes do seu filho (a) e concorda na utilização dos resultados dos testes para pesquisa, após ter lido as informações aqui contidas (ou alguém ter lido para você).

O presente documento será assinado em duas vias, sendo que uma ficará de posse do pesquisador e outra com o responsável pela criança ou adolescente.

O projeto tem por pesquisador responsável Leonardo Aparecido Silva, que pode ser encontrado no endereço Avenida Professor Mello Moraes, 1721, Bloco D, Sala 206, Cidade Universitária, São Paulo-SP, e pode ser contatado pelo Telefone: (15) 9 9771-3928.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a Ética da Pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo, no endereço Av. Prof. Mello Moraes, 1721, Bloco G, 2º andar, sala 27- Cidade Universitária – CEP 05508-030- São Paulo- SP. Telefone 3091-4182.

Nome do Participante: _____

Data de nascimento: ___/___/___ Sexo: () M () F

Nome do Responsável (grau): _____

Número do Documento de Identidade: _____ Telefone: _____

Endereço: _____ CEP: _____

“Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto participar do presente Projeto de Pesquisa”.

São Paulo, data: ___/___/___

Assinatura do Responsável: _____

Assinatura do pesquisador: _____

9.3. TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TALE

Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo
Departamento de Psicologia Experimental - Laboratório da Visão

Você está sendo convidado (a) a participar, como voluntário (a), da pesquisa intitulada “IMPACTO DE DIFERENTES TIPOS DE ALTERAÇÃO DO GENE DA DISTROFINA NA VISÃO DE PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR”. Meu nome é LEONARDO APARECIDO SILVA, sou o Pesquisador Responsável e minhas áreas de atuação são psicologia e neurociências. Após receber os esclarecimentos e as informações a seguir, se você aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está impresso em duas vias, sendo que uma delas é sua e a outra ficará comigo. Esclareço que em caso de recusa na participação você não será penalizado (a) de forma alguma. Mas se aceitar participar, as dúvidas sobre a pesquisa poderão ser esclarecidas pelo pesquisador responsável, sob forma de ligação, através do seguinte celular: (15) 997713928. Ao persistirem as dúvidas sobre os seus direitos como participante desta pesquisa, você também poderá fazer contato com o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo, no endereço Av. Prof. Mello Moraes, 1721, Bloco G, 2 andar, sala 27- Cidade Universitária – CEP 05508-030- São Paulo- SP. Telefone 3091-4182.

Informações Importantes sobre a Pesquisa:

O objetivo será verificar e avaliar possíveis alterações na visão causadas pela Distrofia Muscular de Duchenne e Becker. A avaliação, baseada nos resultados dos exames, será realizada utilizando dois testes com eletrodos (mostrar para o participante) - eles se chamam Eletroretinograma (ERG) e Potencial Visual Evocado (PVE) e testes psicofísicos (para avaliar a discriminação de cores e a sua capacidade de ver contraste em preto e branco). Durante o ERG e o PVE, que serão aplicados ao mesmo tempo, você ficará confortavelmente sentado para observar luzes piscando em um óculos todo fechado nas laterais, parecido com o óculos que os esquiadores usam para proteger os olhos. Se necessário, um colírio será pingado nos seus olhos para ajudar no exame. As respostas serão captadas por um eletrodo colocado na parte inferior do olho, centro da testa, região central da cabeça e outro na região da parte de trás da sua cabeça.

Nos exames psicofísicos algumas imagens às vezes coloridas e às vezes preta e branca serão apresentadas na tela de um tablet em uma sala escurecida. Você ficará confortavelmente sentado e será orientado a responder, falando ou tocando a tela do tablet, quando perceber a imagem e a localização da mesma. Por fim, será realizado o exame feito numa sala escura e que começa com uma luz branca bem forte e depois luzes pequenas verdes ou vermelhas. Um botão de respostas deverá ser acionado quando a luz for percebida. No meio do exame ocorrerá uma adaptação ao escuro por cinco minutos. Nesse tempo você poderá descansar, inclusive fechando os olhos, se preferir.

Os testes oferecem pequenos riscos de dano físico e/ou psicológico. É possível que você sinta um pouco de desconforto na colocação dos eletrodos e na aplicação do colírio, caso seja necessário. A adaptação ao escuro por cinco minutos também pode causar desconforto psicológico. Entretanto, é importante salientar que a pesquisa é conduzida por profissionais (de psicologia e medicina), que poderão cuidar de você caso tenha algum dano físico e/ou psicológico. Os exames poderão ser realizados no mesmo dia ou em dias diferentes com sessões mais curtas.

O estudo é importante porque na distrofia muscular de Duchenne e na distrofia muscular de Becker pode ocorrer alterações visuais que só podem ser identificadas através de uma avaliação mais abrangente para investigar diferentes aspectos do sistema visual. Os dados serão sigilosos e o seu nome não será divulgado. Também será avaliada sua inteligência através de um instrumento de avaliação da capacidade intelectual geral, a escala Wechsler de inteligência para crianças (WISC) para participantes de 6 a 16 anos e para adultos (WAIS) para participantes acima de 16 anos, que será aplicada para estabelecer o nível de inteligência. Então:

- Você fica livre para esclarecer quaisquer dúvidas sobre este estudo antes e durante a pesquisa.
- Sua participação é totalmente voluntária. Você terá a liberdade de recusar a participação na pesquisa ou desistir durante qualquer fase da pesquisa.
- Os resultados serão sigilosos e seu nome não será divulgado. Apenas os dados dos resultados dos exames poderão ser usados em revistas científicas.
- Você poderá tomar conhecimento dos resultados obtidos ao final da pesquisa, se desejar.

Eu _____ aceito participar da pesquisa “IMPACTO DE DIFERENTES TIPOS DE ALTERAÇÃO DO GENE DA DISTROFINA NA VISÃO DE PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR”. Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir durante qualquer fase da pesquisa. O pesquisador tirou minhas dúvidas e conversou com os meus responsáveis. Recebi uma cópia deste termo de assentimento e li (ou leram para mim) e concordo em participar da pesquisa.

São Paulo, ____ de _____ de _____.

Assinatura do menor

Assinatura do pesquisador

10. APÊNDICES

10.1. APÊNDICE 1: ESTATÍSTICA CCT E TABLET CVT

EIXO				t	(p)
PROTAN	CCT	x	Tablet CVT	0,2896	0,7733
DEUTAN	CCT	x	Tablet CVT	0,7931	0,4313
TRITAN	CCT	x	Tablet CVT	1,3613	0,1792

ESTATÍSTICA CONTRAST TEST E TABLET CST

Frequência (cpg)				T	(p)
0,8	Contrast Test	x	Tablet CST	-0,7057	0,4844
1,4	Contrast Test	x	Tablet CST	7,1346	<0,0001
2,0	Contrast Test	x	Tablet CST	6,2698	<0,0001
4,0	Contrast Test	x	Tablet CST	17,8644	<0,0001
10,0	Contrast Test	x	Tablet CST	14,1742	<0,0001
16,0	Contrast Test	x	Tablet CST	11,6831	<0,0001

10.2. APÉNDICE 2: ESTADÍSTICA TABLET CVT

PROTAN				
Grupo	Grupo	F	(p)	(p)
DMD 1	X DMD 2	0,1353	0,7158	
DMD 1	X DMD 3	0,6538	0,5731	
DMD 1	X DMD 4	0,088	0,766	
DMD 2	X DMD 3	0,1474	0,7043	
DMD 2	X DMD 4	0,3883	0,5444	
DMD 3	X DMD 4	1,1408	0,2917	
CTRL	X DMD 1	9,0113	0,0042	< 0,01
CTRL	X DMD 2	5,7069	0,0189	<0,05
CTRL	X DMD 3	4,8075	0,0297	<0,05
CTRL	X DMD 4	13,4484	0,0009	<0,01
CTRL	X BMD	6,0821	0,0163	<0,05
CTRL	X Ups 30	9,0113	0,0042	<0,01
CTRL	X Down 30	8,1198	0,0054	<0,01
Ups 30	X Down 30	0,2894	0,5986	

DEUTAN				
Grupo	Grupo	F	(p)	(p)
DMD 1	X DMD 2	1,8321	0,1802	
DMD 1	X DMD 3	0,1261	0,7243	
DMD 1	X DMD 4	0,0251	0,8696	
DMD 2	X DMD 3	1,0206	0,318	
DMD 2	X DMD 4	3,5093	0,067	
DMD 3	X DMD 4	0,2358	0,6351	
CTRL	X DMD 1	11,8815	0,0014	< 0,01
CTRL	X DMD 2	6,8795	0,0106	< 0,05
CTRL	X DMD 3	9,9327	0,0027	< 0,01
CTRL	X DMD 4	18,1171	0,0002	<0,01
CTRL	X BMD	4,5826	0,0351	<0,05
CTRL	X Ups 30	11,8815	0,0014	<0,01
CTRL	X Down 30	12,8544	0,0008	<0,01
Ups 30	X Down 30	0,4923	0,5081	

TRITAN				
Grupo	Grupo	F	(p)	(p)
DMD 1	X DMD 2	0,0335	0,8497	
DMD 1	X DMD 3	1,8212	0,18	
DMD 1	X DMD 4	0,9715	0,9715	
DMD 2	X DMD 3	1,0126	0,3199	
DMD 2	X DMD 4	0,0151	0,8987	
DMD 3	X DMD 4	1,1821	0,2829	
CTRL	X DMD 1	12,1291	0,0013	<0,01
CTRL	X DMD 2	8,7693	0,0046	<0,01
CTRL	X DMD 3	5,5016	0,0205	<0,05
CTRL	X DMD 4	7,9695	0,0068	<0,01
CTRL	X BMD	7,6302	0,008	<0,01
CTRL	X Ups 30	12,1291	0,0013	<0,01
CTRL	X Down 30	11,6074	0,0013	<0,01
Ups 30	X Down 30	0,6001	0,5532	

10.3. APÊNDICE 3: LIMITE SUPERIOR DE NORMALIDADE NO TABLET CVT

CTRL				
Participante	P	D	T	Idade
1	35.28	32.8	16.26	19
2	37.67	23.56	28.46	17
3	40.94	25.52	46.81	17
4	40.22	34.79	81.66	9
5	48.31	68.97	94.02	10
6	91.92	73.34	118.37	8
7	25.1	24	41.34	20
8	38.46	33.9	52.59	23
9	36.23	41.7	75.12	12
10	55.92	38.28	81.11	24
11	67.25	76.43	90.81	8
12	33.84	33.84	27.62	22
13	14.45	36.24	36.6	24
14	53.46	78.21	73.55	13
15	48.2	35.69	32.7	24
16	27.33	58.39	48.09	24
17	52.91	53.41	34.31	24
18	33.28	20.65	19.16	23
19	48.35	47.57	81.99	13
20	56.64	22.96	76.7	11
21	36.17	55.89	84.57	11
22	43.75	49.38	80.68	11
23	69.69	72.03	104.92	8
24	79.69	55.73	111.03	8
25	27.13	34.25	49.99	17
26	41.78	29.94	95.15	11
27	36.96	58.24	54.32	14
28	21.9	44.33	41.94	16
29	57.91	63.05	106.86	9
30	38.31	65.48	106.97	14
31	68.59	73.8	102.9	5
32	40.45	44.56	78.66	11
33	32.37	43.38	79.38	15
34	35.46	62.24	54.32	14
35	41.52	55.68	64.12	10

36	37.92	44	62.04	15
37	30.81	58.07	64.66	7
38	42.1	38.95	77.64	20
39	42.09	20.92	104.54	24
40	86.69	54.5	37.44	23
41	13.94	62.93	54.48	25
MÉDIA (MED)	44.17	47.50	67.65	15.43
DESVIO PADRÃO (DP)	17.42	16.76	27.71	6.08
2*DP	34.84	33.52	55.42	
MED+2*DP	79.01	81.02	123.08	
LIMITE SUPERIOR DE NORMALIDADE (LS)	79	81	123	

DMD 1

EXON 1-29

Participante	P	D	T	Alteração genética	Idade
1	14.57	29.94	53.13	Deleção exons 3-7	14
2	48.91	145	98.04	Deleção exons 4-17	15
3	155.43	116.58	150.15	Mutação de ponto exon 7	7
4	68.86	67.88	104.11	Deleção exon 7-8	12
5	104.86	68	132.51	Mutação de ponto exon 6	7
6	33.47	38.56	54.46	Mutação de ponto exon 6	18
7	58.11	32.09	31.2	Deleção exons 3-7	18
8	119.93	136.42	91.32	Mutação de ponto 20	12
9	41	45.59	85.2	Deleção dos exons 3 a 7	12
10	27.39	61.66	89.34	Duplicação dos exons 3 a 7	21
11	58.58	50.31	105.74	Deleção 12	9
12	59.16	109.09	82.19	Deleção 3 -12	7
13	36.12	38.89	83.98	Duplicação dos exons 10 a 17	16
14	49.68	33.17	94.02	Duplicação dos exons 10 a 17	10
15	62.18	55.89	114.36	Duplicação exon 2	8
16	52.91	87.23	107.65	Duplicação exon 8-9	12
17	49.06	76.91	78.95	Mutação de exon 20	16
18	139.23	161.62	98.1	Duplicação exon 2	8
19	55.53	53.48	115	Deleção exon 3-7	12
20	63.62	44.18	105.74	Mutação nonsense exon 21	13
MÉDIA (MED)	64.93	72.62	93.75		12.35
DESVIO PADRÃO (DP)	36.84	40.32	26.98		4.08
LS ACIMA	4\20	6\20	2\20		

LS ACIMA %	20%	30%	10%			
DMD 2						
EXON 30-44						
Participante	P	D	T	Alteração genética	Idade	
1	84.68	55.92	181.92	Mutação de ponto exon 31	14	
2	52.35	62.44	75.37	Mutação de ponto exon 37	12	
3	133.46	99.73	154.98	Mutação de ponto exon 37	5	
4	41.48	63.05	77.49	Deleção exons 34-44	10	
5	57.19	71.03	60.98	Deleção exons 12-39	13	
6	185.95	100.62	102.62	Deleção exons 30-43	8	
7	29.62	51.37	34.62	Deleção exon 32	15	
8	15.41	46.64	159.94	Mutação exon 40 frameshift	11	
9	50.18	34.25	88.62	Deleção exon 39	12	
10	51.74	33.07	30.22	Deleção exon 39	18	
11	38.15	32.36	94.59	Deleção exon 42- 43	14	
12	99.19	56.69	129.01	Deleção exon 44	8	
13	32.78	33.89	76.49	Deleção exon 8-39	8	
14	42.72	53	100.33	Mutação intrônica 39	18	
15	38.6	68.97	64.82	Mutação de ponto exon 35	20	
16	55.95	50.1	95.07	Mutação de ponto exon 42	17	
17	52.4	85.57	59.27	Deleção exon 40	11	
18	43.65	51.35	87.69	Mutação nonsense exon 37	20	
19	75.18	83.64	101.39	Deleção exon 32	5	
20	49.06	76.91	78.95	Mutação intrônica exon 22	21	
21	30.84	59.31	84.58	Mutação nonsense exon 34	10	
22	92.22	64.97	61.42	Mutação nonsense exon 38	7	
23	43.75	39.64	113.7	Mutação nonsense exon 38	16	
MÉDIA (MED)	60.72	59.76	91.91		12.73	
DESVIO						
PADRÃO (DP)	37.95	19.90	37.29		4.80	
LS ACIMA	5\23	4\23	4\23			
LS ACIMA %	22%	17%	17%			

DMD 3					
EXON 45-62					
Participante	P	D	T	Alteração genética	Idade
1	47.18	51.75	92.32	Deleção exons 45-52	17
2	101.69	86.51	119.28	Deleção exons 45-57	7
3	66.56	54.31	105.94	Deleção exons 47-50	18
4	82.28	108.59	58.06	Deleção exons 45-52	10
5	66.77	72.47	87.72	Deleção exons 17-50	16
6	36.33	37.33	79.62	Duplicação exons 48-50	13
7	49.03	35.21	73.73	Deleção exons 45-54	18
8	41.57	70.32	94.92	Deleção exons 46-48	12
9	46.09	62.43	60.42	Deleção exons 46-55	12
10	47.03	63.15	68.83	Deleção exons 48-54	18
11	12.77	40	99.18	Deleção e exons xon 45-50	14
12	22.58	27.66	18.7	Deleção exons 45-47	20
13	106.48	78.98	43.73	Deleção exons 45-46	13
14	34.7	59.116	60.86	Deleção exons 49-50	10
15	188.17	228.02	62.55	Deleção exons 46-50	16
16	47.72	119.52	49.42	Deleção exons 49-52	8
17	45.81	65.51	106.13	Deleção exon 51	13
18	21.62	26.18	61.76	Deleção exons 45-50	13
19	46.65	77.05	79.32	Deleção exons 51-60	16
20	43.65	59.24	53.64	Deleção exon 52	16
21	47.29	45.91	79.38	Deleção exons 45-52	12
22	40.66	43.67	82.99	Mutação intrônica exon 50	16
23	24.65	71.89	121.8	Deleção exons 46-51	16
24	82.14	79.68	80.45	Deleção exons 45-52	9
25	71.1	53.49	78.8	Deleção exons 57	10
26	42.9	46.35	104.98	Deleção exons 45	11
27	95.8	84.92	93.82	Deleção exons 48-52	14
28	46.65	77.05	79.32	Deleção exons 51-60	15
29	46.61	40.36	46.81	Mutação nonsense exon 47	20
30	47.47	40.15	84.08	Mutação intrônica exons 45-46	15
31	53.36	56.23	149.53	Deleção exons 43-50	9
32	53.56	149.45	131.03	dupl.45-52	6
33	77.23	53.41	131.91	dupl.45-52	11

MÉDIA (MED)	57.09	68.66	83.06	13.45
DESVIO PADRÃO (DP)	32.39	38.77	28.54	3.64
LS ACIMA	5\33	6\33	3\33	
LS ACIMA (%)	15%	18%	9%	

DMD 4

EXON 63-79

Participante	P	D	T	Alteração genética	Idade
1	53.42	68.97	88.78	Mutação intrônica exon 72	17
2	53.04	55.89	93.12	Mutação de ponto exon 74	7
3	60.75	104.16	78.28	Mutação intrônica exon 69	9
4	76.81	84.51	85.03	Mutação intrônica 69	13
5	57.19	80.12	141.88	Mutação de ponto exon 70	12
6	43.3	48.84	87.02	Deleção exon 74	24
7	92.08	132.19	91.87	Deleção exon 70	14
8	97.57	66.62	96.89	Duplicação meio exon 63	12
9	65.01	49.66	47.45	Deleção exon 57-78	18
10	124.46	78.79	116.25	Mutação nonsense exon 70	12
11	31.94	52.64	101.12	Mutação de ponto exon 74	17
MÉDIA (MED)	68.68	74.76	93.42		14.09
DESVIO PADRÃO (DP)	26.90	25.59	23.27		4.70
LS ACIMA	3\11	3\11	1\11		
LS ACIMA (%)	27%	27%	9%		

BMD					
Participante	P	D	T	Alteração genética	Idade
1	61.94	47.48	95.28	Duplicação exons 3-9	21
2	38.37	39.58	42.68	Deleção exons 45-48	32
3	57.61	68.56	41.64	Deleção exons 48-49	9
4	84.08	264.64	77.28	Deleção exons 45-49	16
5	47.87	52.09	80.72	Duplicação dos exons 3-15	31
6	47.4	87.54	105.06	Deleção dos exons 3 a 7	31
7	111.97	11.56	171.85	Deleção dos exons 45 a 47	44
8	51.77	64.31	102.05	Deleção dos exons 45 a 47	42
9	41	45.59	85.2	Deleção dos exons 3 a 7	12
10	59.96	48.08	193.74	Mutação nonsense exon 22	31
MÉDIA (MED)	60.19	72.94	99.55		26.9
DESVIO PADRÃO (DP)	22.34	70.22	49.21		11.98
LS ACIMA	2\10	2\10	2\10		
LS ACIMA (%)	20%	20%	20%		

10.4. APÉNDICE 4: RESULTADOS ESTADÍSTICOS TABLET CST

0,8 cpg				
Grupo	Grupo	F	(p)	(p)
DMD 1	x DMD 2	0,6648	0,5629	
DMD 1	x DMD 3	0,0845	0,7737	
DMD 1	x DMD 4	0,3936	0,5552	
DMD 2	x DMD 3	0,0130	0,9072	
DMD 2	x DMD 4	0,0018	0,9658	
DMD 3	x DMD 4	0,0103	0,9185	
CTRL	x DMD 1	9,0213	0,0062	<0,01
CTRL	x DMD 2	20,3725	0,0003	<0,01
CTRL	x DMD 3	7,5844	0,0105	<0,05
CTRL	x DMD 4	10,8116	0,0035	<0,01
CTRL	x BMD	2,1048	0,1572	
CTRL	x Ups 30	9,0213	0,0062	<0,01
CTRL	x Down 30	20,7262	0,0002	<0,01
Ups 30	x Down 30	0,2875	0,6033	
1,4 cpg				
Grupo	Grupo	F	(p)	(p)
DMD 1	X DMD 2	1,7157	0,2152	
DMD 1	X DMD 3	1,4244	0,2626	
DMD 1	X DMD 4	3,1903	0,1152	
DMD 2	X DMD 3	0,4299	0,5304	
DMD 2	X DMD 4	0,1589	0,6994	
DMD 3	X DMD 4	0,0863	0,7723	
CTRL	X DMD 1	0,1365	0,7156	
CTRL	X DMD 2	5,6883	0,0230	< 0,05
CTRL	X DMD 3	6,2257	0,0186	< 0,05
CTRL	X DMD 4	6,3879	0,0179	<0,05
CTRL	X BMD	0,8700	0,6367	
CTRL	X Ups 30	0,1365	0,7156	
CTRL	X Down 30	8,6528	0,0057	<0,01
Ups 30	x Down 30	1,8729	0,1829	

2,0 cpq				
Grupo	Grupo	F	(p)	(p)
DMD 1	X DMD 2	0,5252	0,5172	
DMD 1	X DMD 3	0,2196	0,6481	
DMD 1	X DMD 4	2,8834	0,1103	
DMD 2	X DMD 3	0,0057	0,9385	
DMD 2	X DMD 4	4,4223	0,0483	<0,05
DMD 3	X DMD 4	2,0084	0,1697	
CTRL	X DMD 1	10,3173	0,0028	<0,01
CTRL	X DMD 2	6,8119	0,0117	<0,05
CTRL	X DMD 3	5,7959	0,0188	<0,05
CTRL	X DMD 4	16,4539	0,0005	<0,01
CTRL	X BMD	0,0470	0,8239	
CTRL	X Ups 30	10,3173	0,0028	<0,01
CTRL	X Down 30	13,115	0,0009	<0,01
Ups 30	x Down 30	0,0742	0,7829	

4,0 cpq				
Grupo	Grupo	F	(p)	(p)
DMD 1	X DMD 2	0,6935	0,5812	
DMD 1	X DMD 3	0,1411	0,7114	
DMD 1	X DMD 4	1,1788	0,2977	
DMD 2	X DMD 3	0,0596	0,8040	
DMD 2	X DMD 4	0,2236	0,6466	
DMD 3	X DMD 4	0,2069	0,6582	
CTRL	X DMD 1	5,1860	0,0262	<0,05
CTRL	X DMD 2	13,2388	0,0010	< 0,01
CTRL	X DMD 3	8,0427	0,0067	< 0,01
CTRL	X DMD 4	8,0071	0,0074	<0,01
CTRL	X BMD	3,7955	0,0554	
CTRL	X Ups 30	5,1860	0,0262	<0,05
CTRL	X Down 30	17,8399	0,0002	<0,01
Ups 30	x Down 30	0,5185	0,5179	

10,0 cpg				
Grupo	Grupo	F	(p)	(p)
DMD 1	X DMD 2	0,5880	0,5351	
DMD 1	X DMD 3	0,6942	0,5691	
DMD 1	X DMD 4	0,0426	0,8358	
DMD 2	X DMD 3	0,0499	0,8211	
DMD 2	X DMD 4	0,9246	0,6388	
DMD 3	X DMD 4	0,9625	0,6427	
CTRL	X DMD 1	4,4150	0,0439	<0,05
CTRL	X DMD 2	16,6178	0,0006	<0,01
CTRL	X DMD 3	14,7601	0,0010	<0,01
CTRL	X DMD 4	2,1942	0,1488	
CTRL	X BMD	3,1368	0,0865	
CTRL	X Ups 30	4,4150	0,0439	<0,05
CTRL	X Down 30	20,9804	0,0002	<0,01
Ups 30	x Down 30	0,3641	0,5592	

16,0 cpg				
Grupo	Grupo	F	(p)	(p)
DMD 1	X DMD 2	2,8288	0,1180	
DMD 1	X DMD 3	1,8879	0,2009	
DMD 1	X DMD 4	1,0961	0,3312	
DMD 2	X DMD 3	0,0000	0,9924	
DMD 2	X DMD 4	0,1308	0,7243	
DMD 3	X DMD 4	0,0490	0,8241	
CTRL	X DMD 1	0,4797	0,5018	
CTRL	X DMD 2	14,6968	0,0010	<0,01
CTRL	X DMD 3	9,1941	0,0057	<0,01
CTRL	X DMD 4	5,6157	0,0251	<0,01
CTRL	X BMD	0,9771	0,6655	
CTRL	X Ups 30	0,4797	0,5018	
CTRL	X Down 30	23,0033	0,0001	<0,01
Ups 30	X Down 30	5,6291	0,0258	<0,05

10.5. APÉNDICE 5: RESULTADOS ESTADÍSTICOS ENTRE AS IDADES

Grupo		Grupo	F	(p)	(p)
DMD 1	X	DMD 2	0,0805	0,7748	
DMD 1	X	DMD 3	1,0432	0,3128	
DMD 1	X	DMD 4	1,1606	0,2903	
DMD 2	X	DMD 3	0,4008	0,5364	
DMD 2	X	DMD 4	0,5966	0,5484	
DMD 3	X	DMD 4	0,2168	0,6487	
CTRL	X	DMD 1	2,3164	0,1295	
CTRL	X	DMD 2	1,5902	0,2095	
CTRL	X	DMD 3	0,8394	0,6344	
CTRL	X	DMD 4	0,0465	0,8246	
CTRL	X	BMD	23,8824	<0,0001	<0,01
CTRL	X	Ups 30	2,3164	0,1295	
CTRL	X	Down 30	1,5374	0,2153	
Ups 30	X	Down 30	0,8172	0,6282	