

UNIVERSIDA DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE PSICOLOGIA

Sarah Leonardo Dias

Adaptação ao escuro na Distrofia Muscular de Duchenne.

São Paulo

2021

SARAH LEONARDO DIAS

Adaptação ao escuro na Distrofia Muscular de Duchenne.

Versão Original

Dissertação apresentada ao Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Psicologia Experimental

Orientadora: Profa. Titular Dora Selma Fix Ventura

Co-orientador: Dra. Mirella Telles Salgueiro
Barboni

São Paulo

2021

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 Dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Leonardo Dias, Sarah

Adaptação ao escuro na Distrofia Muscular de Duchenne / Sarah Leonardo Dias;
orientador Dora Selma Fix Ventura; co-orientador Mirella Telles Salgueiro Barboni. --
São Paulo, 2021.

121 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Psicologia Experimental) -
- Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, 2021.

1. Adaptação ao escuro. 2. Distrofia Muscular de Duchenne. 3. Bastonete. 4.
Distrofina. 5. Sistema Visual. I. Selma Fix Ventura, Dora, orient. II. Telles
Salgueiro Barboni, Mirella, co-orient. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Sarah Leonardo Dias

Título: “Adaptação ao escuro na distrofia muscular de Duchenne”

Dissertação apresentada ao Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Psicologia Experimental

Dissertação defendida e aprovada em: ___/___/___

Banca Examinadora

Orientador(a) _____

Instituição _____ Assinatura _____

Examinador (a) _____

Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Examinador (a) _____

Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Examinador (a) _____

Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Dedico esse trabalho a minha mãe, Ivete, por ter me dado o maior presente que é a vida e a minha avó Heidi por ter me ensinado a viver e a amar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profa. Dra. Dora Selma Fix Ventura por toda sua dedicação e contribuição à ciência, por ter me recebido muito bem, por toda a paciência que teve comigo desde o início e principalmente por acreditar em mim. É uma honra e orgulho ser sua orientada.

Agradeço à Dra. Mirella Barboni por toda sua dedicação e paciência em me ensinar e orientar sempre muito disposta, mesmo com toda distância física.

Agradeço ao Prof. Marcelo Costa por estar sempre disposto a discutir e me ensinar a fazer ciência. Sou muito grata.

Agradeço ao Professor Russel Hammer pela oportunidade de termos trabalhado juntos e por ter me ensinado que precisamos viver e amar a ciência, minha vida e perspectiva mudou muito.

Agradeço aos membros da UFPA, principalmente ao Prof. Givago da Silva Souza e alunas: Gabriela Sampaio, Alódia Brasil e Terezinha Gonçalves por me acolherem muito bem e estarem ao meu lado em um momento importante. Fez muita diferença durante esse período, além do prazer de tê-las conhecido.

Agradeço aos membros do PSE Fátima e Prof. Dr. Nicolas Châline por serem muito prestativos e atenciosos quanto às solicitações e dúvidas do cotidiano.

Agradeço a todos os colegas do Laboratório da visão por termos trabalhados juntos nesse projeto.

Agradeço à minha colega de profissão Cristiana Castello Branco, por toda ajuda e apoio psicológico. Foi muito importante e fez muita diferença durante todo esse percurso.

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

Agradeço ao Dr. Luiz Fernando Grossklauss e à equipe de investigação de Doenças Neuromusculares da Universidade Federal de São Paulo por fornecerem os resultados dos exames de DNA dos pacientes.

Agradeço ao Prof. Dr. Max Damico e a Dr. Kallene Summer por todo carinho e pelas avaliações dos pacientes e voluntários.

Agradeço principalmente aos meus pais Ivete Fatima Leonardo Dias e José Rubens Dias por acreditarem em mim e sempre me encorajarem nesse processo. Tenho muito orgulho em ser filha de vocês.

Agradeço à tia Lais Dias pelo apoio financeiro.

Agradeço ao meu companheiro Vitor Maronezzi por toda paciência e dedicação ao meu lado em todo esse processo.

Agradeço em especial à Profa. Dr. Amanda Braga, pois enquanto ela estava nesse processo eu me inspirei e acredito que ela tenha grande influência nessa decisão.

RESUMO

Dias, S. L. (2021). *Adaptação ao escuro na distrofia muscular de Duchenne* (Dissertação de Mestrado). Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma doença genética recessiva ligada ao cromossomo X que resulta de mutações ou deleções no gene da distrofina, afetando a expressão de suas proteínas (Dps). Estas alterações resultam principalmente em grave comprometimento muscular. As alterações respiratórias decorrentes da insuficiência do músculo cardíaco e do diafragma, levam os pacientes à morte até o final da segunda década de vida. As Dps são necessárias para o funcionamento normal do sistema nervoso central. A retina é o local de expressão de quatro Dps - Dp427, Dp260, Dp140 e Dp71- e estudos prévios revelaram que a ausência de Dps na retina, causa alterações no eletrorretinograma (ERG) e em funções visuais como visão de cores e sensibilidade ao contraste temporal e espacial. O objetivo do presente estudo foi avaliar o curso temporal da adaptação ao escuro dada a possibilidade de perda de sensibilidade nos fotorreceptores cones e bastonetes. Além de examinar possíveis diferenças de desempenho nessa função relacionadas com os diferentes locais em que podem ocorrer mutações no gene *DMD*. Dado conhecimento prévio sobre a presença e o papel da isoforma Dp260 na retina, consideramos os pacientes com DMD com alterações anteriores (*upstream*) ao exon 30 (DMD U), promotor da Dp260, que não afetam sua expressão, ou posteriores (*downstream*) ao exon 30, que afetam a expressão da Dp260 (DMD Dp260) e dependendo de onde ocorram podem afetar a expressão de outras Dps. Para avaliar a adaptação ao escuro foi realizado um teste psicofísico não invasivo em 20 pacientes com DMD, dos quais 7 DMD U (idade média = $14,00 \pm 6,27$ anos), 9 DMD Dp260 (idade média = $13,67 \pm 3,12$), 4 DMD Dp71, com alterações na Dp71 (idade média = $14 \pm 4,24$) e 21 controles (idade média = $26,05 \pm 5,95$ anos). Um protocolo curto, previamente relatado pelo nosso grupo (Nagy et al., 2017) foi utilizado para medir o nível de luminância de adaptação dos bastonetes. O protocolo total tem duração de 20 minutos com os seguintes passos: adaptação ao claro de um minuto com luminância de 3000 cd/m^2 ; em seguida apresentação de estímulos luminosos de cor vermelha e verde por 8 minutos cuja intensidade era aumentada até sua detecção pelo observador. Logo após, o sujeito era adaptado ao escuro por 5 minutos seguido pela segunda etapa na qual a luminância para detecção de estímulos verdes era determinada. Foram medidos o tempo para a ocorrência da quebra entre as curvas dos cones e dos bastonetes e os limiares adaptados ao escuro dos cones e bastonetes. Os pacientes DMD Dp260 apresentaram elevação do tempo da

quebra entre cones e bastonetes e do limiar de detecção de luz dos bastonetes quando comparados com pacientes com DMD U e com controles. No entanto, o limiar de luminância na quebra dos cones e bastonetes foi semelhante nos três grupos. Concluímos que, enquanto pacientes DMD Dp260 apresentam uma redução na sensibilidade dos bastonetes ($p=0,04$), os pacientes DMD U não apresentam prejuízos significativos. Surpreendentemente, os pacientes DMD Dp71, cuja Dp260 está deletada, também não apresentaram prejuízo significativo na sensibilidade dos bastonetes. Os três grupos não apresentaram diferenças estatísticas no limiar dos cones. Nossa hipótese de que há um prejuízo na adaptação ao escuro em pacientes com mutações na Dp260 se confirma nesse estudo.

Palavras-chave: Adaptação ao escuro; Bastonete; Distrofina; Sistema visual; Retina; Distrofia muscular de Duchenne.

ABSTRACT

Dias, S. L. (2021). *Dark adaptation Duchenne Muscular Dystrophy* (Master's Dissertation).

Institute of Psychology, University of São Paulo, São Paulo.

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is a recessive genetic disease associated to the X-chromosome that results from mutations or deletions in the dystrophin gene (DMD), affecting the expression of its proteins (Dps). These alterations result mainly in severe muscle impairment. Respiratory changes caused by insufficiency of the cardiac muscle and the diaphragm, due to quick muscle loss, take patients to death by the end of the second decade of life. Dps are also necessary for normal function of the central nervous system. Four Dps are expressed in the retina - Dp427, Dp260, Dp140 e Dp71 – and previous studies showed that their absence, causes alterations in the electroretinogram (ERG) and in visual functions as color vision and temporal and spatial contrast sensitivity. The goal of this work was to assess the temporal course of the dark adaptation and final cone and rod photoreceptor thresholds, to investigate possible losses of sensitivity. The goal was also to examine if visual performance was related to the locus of *DMD* gene mutations. Given the previous knowledge about the presence and its function of the Dp260 isoform in the retina we considered DMD patients with alterations before exon 30 (upstream, DMD U), Dp260 promoter, or after exon 30 (downstream, DMD D), which affect the expression of Dp260, and depending where they occur may affect the expression of one or more of the other Dps. In order to evaluate dark adaptation, we used a non-invasive psychophysical test. We examined 20 DMD patients, 7 DMD U (mean age= 14.00±6.27 years), 9 DMD D260 (mean age= 13.67 ± 3.12) and four DMD D with alteration in Dp71 (DMD D71, mean age= 14 ± 4.24). The control group was composed by 21 healthy volunteers (mean age= 26.05 ± 5.95 years). A short dark adaptation protocol, previously reported by our group (Nagy et al., 2017) was used. The total session duration was 20 minutes with the following steps: one minute exposure to a 3000 cd/m² light; followed by luminance threshold determination of alternating red and green color lights for 8 minutes. After that, there was a 5 minute period in the dark, followed by the second part of the protocol, in which luminance thresholds for detection of the green stimulus were determined. We measured the time for the rod/cone break in the dark adaptation curve and the final cone and rod thresholds. DMD Dp260 patients, showed elevation of the break time and of the rod luminance thresholds when compared to DMD U patients and with control. No difference was found in the luminance thresholds needed for the rod/cone break in the three groups. We concluded that while DMD

Dp260 patients presented a reduction of rod sensitivity ($p=0.04$), the DMD U patients did not present significant damage on rod sensitivity. Surprisingly, the DMD Dp71 patients, in which, in addition to Dp260, Dp71 is deleted, also did not present significant damage in rod sensitivity. No differences in cone sensitivity were found among the three groups. Our hypothesis of a loss in the dark adaptation of patients that have Dp260 mutation was confirmed in this study.

Key-words: Dark Adaptation. Rod cell. Dystrophin. Visual system. Retina. Duchenne Muscular Dystrophy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Manobra ou sinal de Gower O sinal de Gowers, também conhecido como manobra de Gowers ou manobra do levantar miopático, é um sinal médico que indica fraqueza dos músculos proximais, especificamente aqueles do membro inferior. O sinal descreve um paciente que usa suas mãos para "escalar" seu próprio corpo a partir de uma posição agachada devido à falta de força muscular no quadril e coxas. O sinal recebe o nome em homenagem ao médico neurologista britânico William Richard Gowers (1845-1915). 17

Figura 2. Representação do gene, dos promotores da distrofina e suas diferentes isoformas (A) Localização do gene da distrofina (cromossomo X - Xp21). (B) Localização dos exons que compõem o gene da distrofina (linhas verticais pretas) e os promotores B, M, P, R, B3, S e G (setas), e as respectivas. 19

Figura 3. Esquema de organização da retina humana com separação de camadas e tipos de células e estruturas encontradas em cada uma delas. 21

Figura 4. Estrutura básica dos cones e bastonetes. A) Morfologia dos fotorreceptores. B) Segmento externo dos fotorreceptores. 21

Figura 5. Representação esquemática da retina de mamíferos. Existem seis tipos de neurônios distribuídos na camada da retina de mamíferos: 1- bastonetes, 2 – cones, 3 – células horizontais, 4 – células bipolares, 5 – células amácrinas, 6 – células ganglionares da retina. Em “b” representa o esquema representando os pedículos, o terminal sináptico dos cones, nos quais as sinapses em fitas estão em contraposição aos dendritos de células horizontais (em laranja) e os dendritos da célula bipolar ON (em azul), esse arranjo sináptico é denominado de tríade. Os dendritos das células bipolares OFF realizam sinapses com base dos pedículos (em roxo). Em “c” mostra a representação esquemática de uma esférula, o terminal sináptico dos bastonetes, na qual a sinapse em fita está em contraposição aos dendritos de células horizontais (em laranja) e ao dendrito de uma célula bipolar (em azul). O dendrito de uma célula bipolar associada à cones (em azul) que contém cerca de 50 sinapses em fita e realiza sinapses com processos de células amácrinas pós sinápticas (em laranja) e dendritos de células ganglionares (em roxo). Em “e” uma aproximação de sinapse entre a célula bipolar (em azul), processo de célula amácrina (em laranja) e dendritos da célula ganglionar (em roxo). As células amácrinas realizam sinapses em retroalimentação com as células bipolares. Este arranjo sináptico é denominado de díade. As células amácrinas também realizam numerosas sinapses convencionais com outras células amácrinas e células ganglionares na camada (OPL) na qual podem realizar sinapses. (OS//IS: segmentos externos e internos de cones e bastonetes; ONL: camada nuclear externa; OPL: camada plexiforme externa; INL: camada nuclear interna; IPL: camada plexiforme interna; GCL: camada de células ganglionares; NFL: camada de fibras de nervo óptico). 24

Figura 6. Representação de um ERG clássico definido pela norma da ISCEV. As setas em negrito indicando para baixo representa o flash do estímulo uV, as setas longas representam a amplitude da onda a e da onda b e a seta na horizontal representa o tempo em ms. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 7. Representação da localização da distrofina e dos distroglicanos na invaginação do complexo sináptico do bastonete. B = dendrito da célula bipolar e H = processo da célula horizontal.....26

Figura 8. Eletrorretinogramas mostram redução da onda-b em pacientes com Duchenne e controle. Foram testados 16 meninos DMDs, 7 meninos com alterações nos exons de 8 a 11 e 9 meninos com alteração no exon 44 ou acima..27

Figura 9. ERGs escotópicos clínicos de indivíduos normais, DMD e CSNB.(DMD) ausência de uma onda b para estímulos azul, vermelho e branco em condições de teste escotópico. Apenas as oscilações do cone podem ser vistas na resposta ao estímulo vermelho. A resposta a um flash branco brilhante mostra apenas a onda fotorreceptora gerada por um fotorreceptor. (CSNB) As respostas escotópicas na CSNB são semelhantes às registradas na DMD sem contribuição de bastonetes e um ERG negativo a um estímulo branco brilhante27

Figura 10. Curva típica de adaptação ao escuro de humanos adultos.Os pontos em vermelho representam a adaptação relacionada aos cones, enquanto que os pontos azuis, são relacionados à adaptação dos bastonetes. A área sombreada representa a faixa de adaptação encontrada em 80% do grupo de indivíduos..... 30

Figura 11. Curvas de adaptação ao escuro mostrando limiar de luminância para a detecção de luz em função do tempo no escuro.As linhas contínuas representam a resposta de um sujeito controle e as linhas pontilhadas representam respostas de pacientes DMD com mutações no exon 48-52. Linhas vermelhas mais finas representam a resposta à luz vermelha e linhas verdes mais grossas representam as respostas à luz verde. Note-se que os limiares foram semelhantes para a luz vermelha, mas nunca foi atingido pelo paciente com DMD o limiar dos bastonetes e também a quebra dos cones nos 8 minutos.. 33

Figura 12. Sequência de teste: 1) luminância para adaptação ao claro selecionada a partir de níveis de luminância testados 3000cd / m². Luzes de teste vermelha e verde são apresentados com a luminância mudando dinamicamente dependendo da resposta do sujeito sendo testado. 3) Cinco minutos de adaptação ao escuro. 4) Seis minutos de teste com apenas estimulação verde, iniciando em níveis de luminosidade abaixo do limiar. 39

Figura 13. Foto do equipamento – Ganzfeld..... 40

Figura 14. Gráfico da correlação de sexo apenas no grupo controle. No eixo Y representa o log em cd/m² e no eixo x os dois protocolos, dos bastonetes e dos cones e os dois grupos (sexo) feminino representado em azul e masculino representado em verde. 44

Figura 15. Limiares de luminância dos cones. Box plots mostrando os limiares de luminância em log cd/m² para os quatro grupos (CTRL; DMD U; DMD D; DMD Dp71) no protocolo dos cones a partir das médias individuais de cada sujeito. Os pontos representam a média de cada indivíduo e o “x” representa a média do grupo.. 45

Figura 16.Limiares de luminância dos bastonetes. Box plots mostrando os limiares de luminância em log cd/m² para os quatro grupos (CTRL; DMD U; DMD D; DMD Dp71) no

protocolo dos bastonetes a partir das médias individuais de cada sujeito. Os pontos representam a média de cada indivíduo e o “x” representa a média do grupo.47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais diferenças entre cones e bastonetes.	22
Tabela 2. Média e desvio padrão das idades dos participantes.....	36
Tabela 3. Participantes com Distrofia Muscular de Duchenne.....	36
Tabela 4. Média e Desvio Padrão da idade dos três grupos participantes. Erro! Indicador não definido.	
Tabela 5. Correlação de idade da amostra total através na análise de Pearson.	43
Tabela 6. Correlação de idade apenas no grupo controle.	43
Tabela 7. A tabela abaixo indica as médias entre os sexos e os resultados do teste t de Student.	44
Tabela 8. Limiares de Luminância dos Cones.....	44
Tabela 9. Média das respostas dos Cones estimado pelo modelo linear misto.	45
Tabela 10. Limianes de luminância para os bastonetes.....	46
Tabela 11. Média dos limiaresdos bastonetes estimadas pelo modelo misto.	46
Tabela 12. Comparação entre os grupos pelo teste de Mann-Whitney.	47

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
CK	Creatinina Quinase
CSNB	Cegueira Noturna Estacionária Congênita
dB	Decibel
DMB	Distrofia Muscular de Becker
DMD	Distrofia Muscular de Duchenne
DMRI	Degeneração Macular Relacionada à Idade
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Dp	Dystrophin
EPR	Epitélio Pigmentar da Retina
ERG	Eletrorretinograma
GCL	Camada de Células Ganglionares
INL	Camada Nuclear Interna
MGGs	Células Gliais de Müller
MLI	Membrana Limitante Interna
nm	Nanometro
ONL	Camada Nuclear Externa
SNC	Sistema Nervoso Central

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Distrofia Muscular de Duchenne.....	16
1.2 O Processamento Visual	20
1.3 O Sistema Visual na DMD	25
1.4 Adaptação ao Escuro	28
1.4.1 Adaptação ao escuro na Distrofia Muscular de Duchenne.....	32
2 JUSTIFICATIVA	34
3 OBJETIVO GERAL	35
3.1 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	35
4 MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 PARTICIPANTES	36
4.2 AVALIAÇÃO OFTALMOLÓGICA	37
4.2.1 Avaliação genética	38
4.2.2 Avaliação Psicofísica.....	38
4.2.3 Análise dos dados.....	40
5 RESULTADOS	43
5.1 ANÁLISE DA IDADE DOS PARTICIPANTES	43
5.2 ANÁLISE DE SEXO	43
5.3 RESULTADO DOS CONES	44
5.4 RESULTADO DOS BASTONETES	46
6 DISCUSSÃO	49
7 CONCLUSÃO.....	52
REFERÊNCIAS	53
APÊNDICES.....	60
ANÊXOS.....	97

1 INTRODUÇÃO

1.1 DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) foi descrita pelo médico neurologista, Guillaume Benjamin Amand Duchenne em 1868 em Paris, na França. A DMD é a doença mais comum entre as distrofias musculares, afetando 1 a cada 3.500 crianças nascidas com vida. Além da DMD, temos Distrofia Muscular de Becker, Distrofia Muscular de Cinturas, Distrofia Muscular Facio-Escápulo-Umeral, Distrofia Muscular de Steinert e Distrofia Muscular Congênita (Kiyomoto et al., 1999; Zatz, 2002). A DMD é caracterizada pela perda progressiva dos movimentos, afetando inicialmente os membros inferiores e posteriormente os membros superiores, com pseudohipertrofia progressiva dos músculos afetados e aumento significativo do tecido conjuntivo e tecido adiposo (Emery, 1980; Saldanha et al., 2005).

Os indivíduos mais afetados pela DMD são geralmente crianças do sexo masculino, que passam a apresentar sintomas motores entre 3 a 5 anos de idade, como por exemplo, dificuldade para subir escada, para se levantar de uma posição sentada ou passar da posição sentado para em pé e para sustentar seu corpo em pé. Em torno dos 6 anos de idade, as crianças tendem a andar nas pontas dos pés e apresentam deformidades do corpo, devido ao problema muscular. A perda muscular na DMD é muito rápida e leva a maioria das crianças a utilizar cadeira de rodas por volta dos 13 anos de idade (Figura 1) (Emery, et al., 2015; Manzur et al., 2008).



Figura 1. Manobra ou sinal de Gower O sinal de Gowers, também conhecido como manobra de Gowers ou manobra do levantar miopático, é um sinal médico que indica fraqueza dos músculos proximais, especificamente aqueles do membro inferior. O sinal descreve um paciente que usa suas mãos para "escalar" seu próprio corpo a partir de uma posição agachada devido à falta de força muscular no quadril e coxas. O sinal recebe o nome em homenagem ao médico neurologista britânico William Richard Gowers (1845-1915). Ribeiro, 2017.

Além do prejuízo motor, outras características não motoras, como o atraso no desenvolvimento global, graves dificuldades de aprendizagem, autismo e alterações no fígado, podem se manifestar (Manzur et al., 2008). Para saber o diagnóstico de DMD na infância, são realizados exames de sangue para verificar o nível plasmático da enzima creatinina quinase (CK); caso o resultado seja elevado, o paciente apresenta a doença desde o seu nascimento. Os níveis plasmáticos de CK elevada revelam alterações, infecções e inflamações que estão relacionadas às lesões nos músculos. O conhecimento do nível de CK é importante apenas no início do tratamento, pois em pacientes mais velhos (que na sua maioria já fazem uso de cadeira de rodas), os níveis de CK diminuem com a progressão da doença, devido a perda muscular e à atividade física reduzida (Manzur et al., 2008). Outros exames laboratoriais importantes para o diagnóstico inicial de DMD são taxa de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), enzimas presentes no fígado que podem estar alteradas revelando hepatopatias agudas e alterações no fígado (Manzur et al., 2008).

Outra forma de identificar a DMD, além do exame de sangue, são os exames genéticos para detecção de mutações que ocorrem no gene da distrofina (*DMD*), situado no braço curto do cromossomo X (Xp21) (Muntoni et al., 2003). O gene *DMD* é responsável pela transcrição das proteínas distrofinas que desempenham funções essenciais como parte de um complexo proteico transmembrânico composto por cinco classes de proteínas, distrofina, distrobexina, distroglicana, sarcoglicana e sarcospana, que juntas atuam no tecido muscular garantindo a ligação entre o citoplasma e o citoesqueleto das fibras musculares (Werneck & Bonilla, 1990; Yiu & Kornberg, n.d.).

A DMD é uma doença genética recessiva que pode ser transmitida pela mãe heterozigota (Koenig, et al., 1987; Zatz, et al., 1981). São encontradas três diferentes mutações no gene da distrofina, e a mais comum é a perda de uma parte do gene *DMD* (deleção), que ocorre em 60% dos casos, seguida pela mutação de ponto, em 45% dos pacientes e pela duplicação do gene, nos 5% restantes (Koenig, et al., 1989; Lindlof et al., 1989; Muntoni et al., 2003). Em 1/3 dos casos ocorrem novas mutações no gene *DMD* não herdadas geneticamente enquanto em 2/3 dos casos a alteração genética é transmitida pela mãe (Zatz, M. 2002). O gene *DMD* apresenta uma complexa regulação de transcrição de proteínas com sete promotores. A proteína completa (Dp427) é inicialmente transcrita por 3 promotores e apresenta elevado peso molecular. Promotores intragênicos, responsáveis por dar início ao processo de transcrição de proteínas de menor peso molecular, estão localizados em diferentes locais ao longo do gene *DMD*. O primeiro promotor (M) é ativado nos músculos esqueléticos, células cardíacas vasculares endoteliais e células da glia no sistema nervoso central (SNC); o segundo promotor, o promotor C é ativado no córtex cerebral, nos neurônios da região CA3 do hipocampo; o terceiro promotor, o promotor P dirige a síntese da proteína distrofina nas células cerebelares de Purkinje e está presente no córtex cerebral fetal. Esses três promotores iniciais são responsáveis pela transcrição da Dp427 (Blake et al., 2002). O gene *DMD* possui outros quatro locais de transcrições intragênicas menores iniciadas por outros promotores que utilizam um único exon de referência. O promotor R localizado próximo ao exon 30, é responsável pela proteína Dp260 (D'Souza et al., 1995); o promotor B3, no exon 45, é ativado no cérebro. Esse promotor é responsável pela transcrição da proteína Dp140. O promotor S, no exon 56, é ativado nas células de Schwann, responsáveis pela produção de mielina no sistema nervoso periférico, e é responsável pela expressão da proteína Dp116 (Byers et al., 1993). O promotor G (geral) encontra-se amplamente distribuído em diversos grupos celulares, como fígado, pulmão, rim etc. O promotor está localizado no exon 63 e é responsável pela expressão da proteína Dp71 (Bar et al., 1990). A Dp71 também é expressa na retina de mamíferos pelas células gliais de

Muller (MGCs) na membrana limitante (MLI) e pelos astrócitos nos vasos sanguíneos (Austin et al., 2000) (Figura 2).

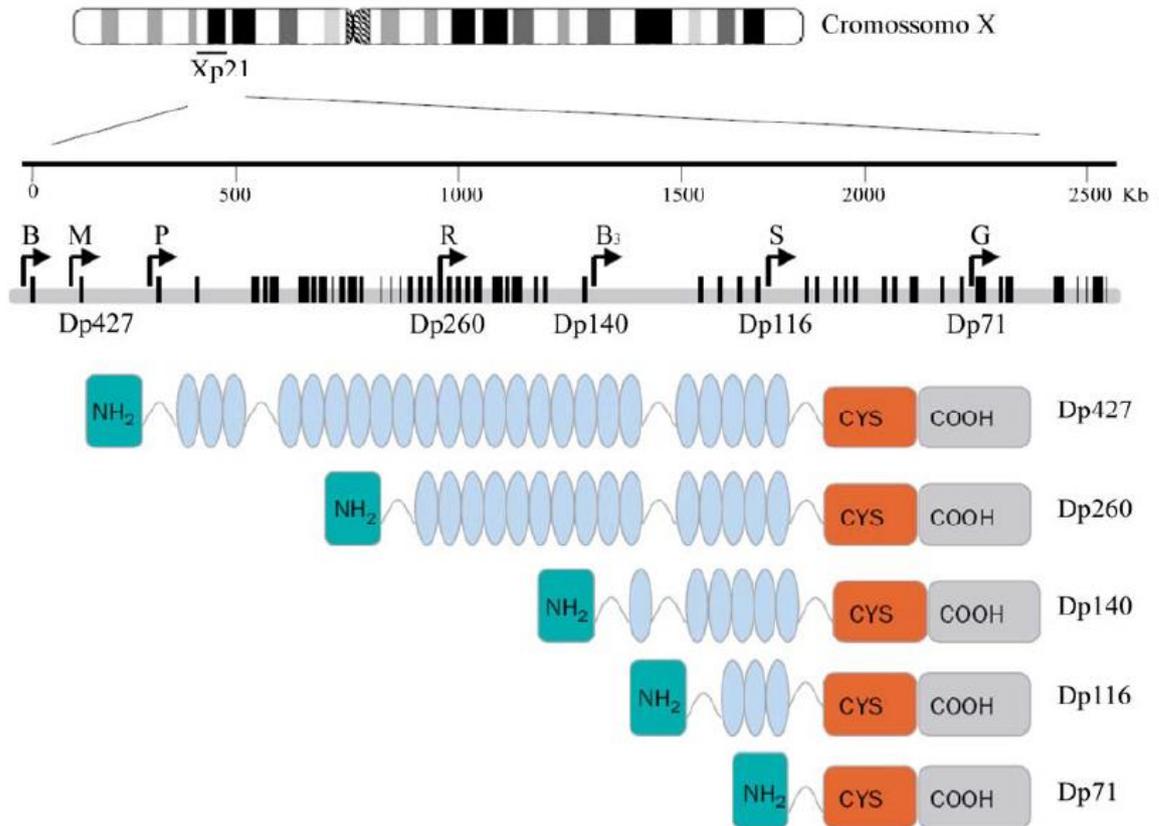


Figura 2. Representação do gene *DMD*, os promotores da distrofina e suas diferentes isoformas. Localização do gene da distrofina (cromossomo X - Xp21). Logo abaixo é apresentado a localização dos exons que compõem o gene da distrofina (linhas verticais pretas) e os promotores B, M, P, R, B₃, S e G (setas), e as respectivas Dp (do inglês: Dystropin) (Manzur et al., 2008)

As proteínas distrofinas são muito importantes para o funcionamento do sistema nervoso central, além da função no sistema motor (Rodius et al., 1997). No sistema nervoso central, a distrofina está associada aos canais iônicos dos neurônios (Lidov et al., 1990; Mehler, 2000) é necessária para a sinaptogênese (Jamel et al., 1988; Lidov et al., 1990; Lidov & Kunkel, 1997; Morris et al., 1995) além de estar envolvida na estabilidade mecânica dos terminais sinápticos de alguns neurônios (Blank, et al., 1997).

1.2 ESTRUTURA DA RETINA.

A retina humana é constituída por cinco grupos principais de células neurais que, junto com as células gliais, efetuam os primeiros estágios do processamento da informação visual. As células neurais da retina estão dispostas em três camadas nucleares: as células fotorreceptoras, cujos núcleos celulares estão na camada nuclear externa ONL (do inglês: outer nuclear layer), células bipolares *ON* e *OFF*, horizontais e amacrinas que estão na camada nuclear interna INL (do inglês: inner nuclear layer) e as células ganglionares *ON* e *OFF*, que estão na camada de células ganglionares GCL (do inglês: ganglion cell layer) (Figura 3) (revisão por Joselevitch, 2008). Essas três camadas nucleares são intercaladas por outras duas que contém prolongamentos axônicos ou dendríticos e contatos sinápticos, as camadas plexiforme externa e plexiforme interna. A camada plexiforme externa contém sinapses ligando os axônios dos fotorreceptores aos dendritos de células bipolares e horizontais e a camada plexiforme interna contém as conexões das células bipolares e amácrinas com as células ganglionares (Kolb, 2003).

O trabalho fundamental dos fotorreceptores é transformar a luz, que é energia eletromagnética, em sinal neural através do processo chamado de fototransdução. A fototransdução resulta na modulação da liberação do neurotransmissor glutamato pelos fotorreceptores. Os fotorreceptores não produzem potenciais de ação, mas respondem à estimulação luminosa através de mudanças graduais de seus potenciais de membrana (revisão por: Joselevitch, 2008).

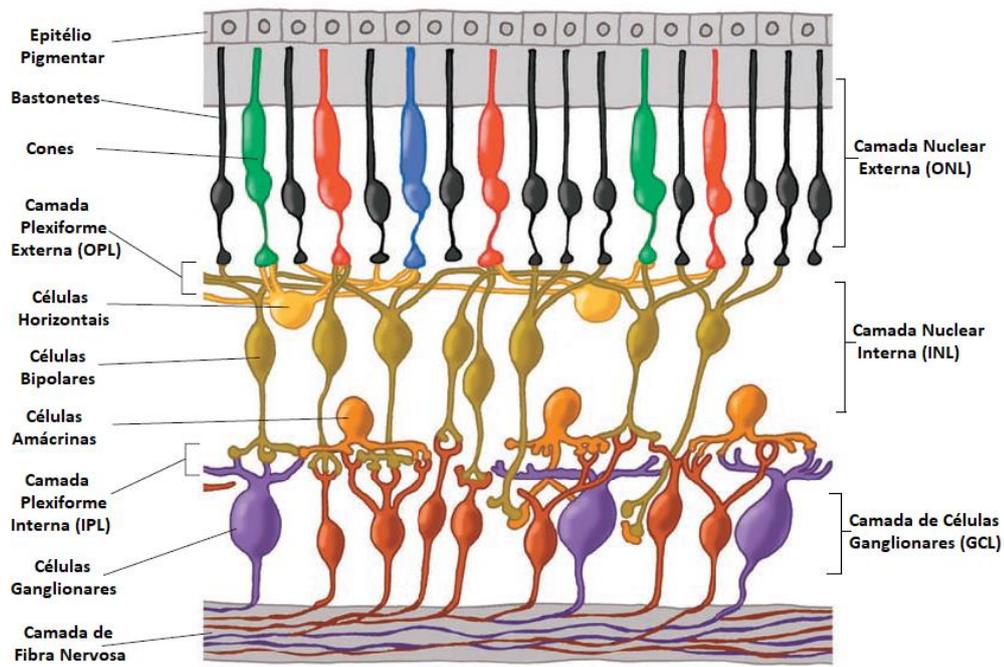


Figura 3. Esquema de organização da retina humana com organização de camadas e tipos de células. OPL (do inglês: outer plexiform layer); IPL (do inglês: inner plexiform layer); ONL (do inglês: outer nuclear layer); INL (do inglês: inner nuclear layer); GCL (ganglion cell layer) (Modificado de Kolb, 2013).

A retina humana possui cerca de 6 milhões de cones que estão concentrados no centro da retina, a fóvea. Os cones apresentam uma forma alongada, com segmentos externos de forma cônica (Figura 4). São responsáveis por várias funções da visão diurna (fotópica) como a acuidade visual máxima, visão de cores, a amplitude de contraste máxima. O sistema de cones possui alta resolução temporal, pois a molécula do pigmento visual se regenera rapidamente, e alta resolução espacial devido à convergência de poucos cones para um único neurônio de segunda ordem (Burns & Lamb, 2003; Davson, 1980; Rodieck, 1998). Existem três tipos de cones que apresentam fotopigmentos que respondem à luz de diferentes faixas de comprimentos de onda. O cone S contém opsina sensível maximamente à faixa espectral de comprimentos de onda curtos, com pico de absorção em 420 nm (faixa azul); o cone M contém opsina sensível maximamente à faixa de comprimentos de onda médios, com pico de absorção da luz em 530 nm (faixa verde); e o cone L contém opsina sensível maximamente à faixa de comprimentos de onda longos com pico de absorção em 557 nm (região do amarelo) (Schwartz, 2010).

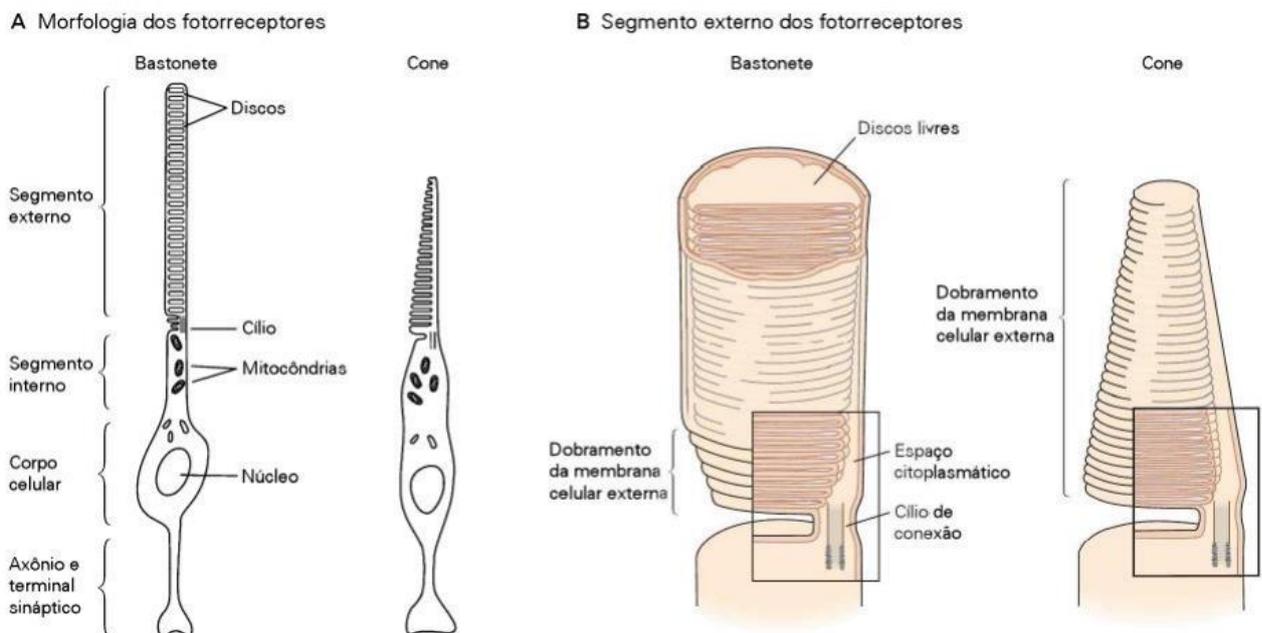


Figura 4. Estrutura básica dos cones e bastonetes. Modificado de Oliveira, (2017).

Os bastonetes estão distribuídos por quase toda retina, menos na região mais central (fóvea), e estão em grande quantidade na periferia média da retina (20° da fóvea). Portanto, durante a visão noturna (escotópica) objetos não podem ser percebidos pela área central da

retina. Na retina humana há cerca de 120 milhões de bastonetes que apresentam forma cilíndrica. O sistema dos bastonetes não permite visão de cores por ter um só tipo celular, possui baixa acuidade visual e baixa visão de contraste (Tabela 1). O sistema de bastonetes possui baixa resolução temporal, devido ao tempo que a molécula do fotopigmento visual necessita para se regenerar, e possui baixa resolução espacial, devido à convergência de um número consideravelmente maior de bastonetes para um único neurônio de segunda ordem quando comparado aos cones (Burns & Lamb, 2003; Davson, 1980; Rodieck, 1998). Os bastonetes são mais sensíveis do que os cones, eles tem seu pico de absorção em 505 nm, com isso em ambientes pouco iluminados conseguimos detectar imagens e podemos discriminar diferentes áreas como, claro e escuro (Dartnall, et al., 1983).

Tabela 1. Principais diferenças entre cones e bastonetes.

	Cones	Bastonetes
Morfologia geral	segmento externo cônico	segmento externo cilíndrico
Fotopigmento	opsinas de cones	Rodopsina
Número de fita sinápticas	20-40	1-2
Nível de luz	Fotópico	Escotópico
Sensibilidade absoluta	Baixa	Alta
Saturação	Não	Sim
Velocidade de resposta	Rápida	Lenta
Capacidade de adaptação à luz	Ampla	Limitada
Adaptação ao escuro	Rápido	Lento
Pico de sensibilidade espectral	depende da opsina	~ 500 nm

Fonte: Ebrey & Koutalos, 2001; Migdale et al. 2003; Chun, et al., 1996; Burns and Lamb, 2003; Pugh & Lamb, 2000; Dartnall, et al., 1983; Joselevitch, 2008 (modificada)

Os rodopsinas são proteína transmembrânares, constituída por uma parte proteica associada a uma molécula cromóforo 11-cis-retinal, derivada da vitamina A1 na maioria dos vertebrados. A rodopsina tem função de absorção da luz. Com apenas uma rodopsina ativada, pode ocorrer a ativação do bastonete (Saari et al., 1994; Wu et al., 2006). A incidência de luz faz com que a molécula de rodopsina se decomponha e haja separação dos dois componentes, a opsina e o retinal. Após um determinado tempo a opsina e o retinal são recombinados, por processos metabólicos da célula, e formam uma nova rodopsina ativa. Sua recuperação completa pode levar de 15 a 20 minutos, motivo pelo qual é necessário aguardar alguns minutos para começar ver em um ambiente escuro, após ter permanecido muito tempo em um local com claridade (Schwartz, 2010). Em níveis medianos de intensidade luminosa, os cones e bastonetes

podem ser ativados simultaneamente, o que é conhecido como visão mesópica, é comparada à visão do entardecer (por do sol) (Buck, 2003).

Nos cones a regeneração ocorre sob luz fraca, esta conversão é realizada em células do epitélio pigmentar da retina (EPR) por uma via enzimática chamada de ciclo visual. Sob condições de luz do dia, no entanto, fotoisomerização de opsinas visuais em bastonetes e cones supera em muito a síntese de 11cRAL por esta via (Mata et al., 2002). O mecanismo pelo qual os fotorreceptores de mamíferos mantêm a sensibilidade à luz em condições de luz do dia ainda é desconhecida. O acúmulo de evidências sugere a existência de um segundo ciclo visual que regenera os pigmentos visuais do cone pelo menos em parte da retina neural. Cones, mas não bastonetes, mostram recuperar fotossensibilidade após exposição à luz em retinas isoladas de várias espécies, incluindo humanos e camundongos (Goldstein, 1970; Hood & Hock, 1973; Wang & Kefalov, 2009). Só 11cRAL pode regenerar opsina branqueada, essas observações sugerem ainda que os cones, mas não os bastonetes, contêm um 11-cis-retinol (11cROL) em atividade da desidrogenase (11cRDH) que converte 11cROL em 11cRAL (Mata et al., 2002; Sato & Kefalov, 2016).

Existem dois tipos de sinapses entre cones e bastonetes com os neurônios de segunda ordem como células bipolares e células horizontais. Os bastonetes apresentam sinapse invaginada com as células bipolares *ON* e células horizontais. A sinapse invaginada é mais complexa, pois nesta sinapse os processos dendríticos das células bipolares e horizontais ocorrem dentro de uma cavidade existente na membrana pré-sináptica dos fotorreceptores. Já os cones apresentam sinapse invaginada com células bipolares *ON* e a maior parte das transmissões sinápticas com células bipolares *OFF* ocorrem através da sinapse basal, que é semelhante às sinapses de outros locais do sistema nervoso (Figura 5) (Morigiwa & Vardi, 1999; Vardi et al., 1998).

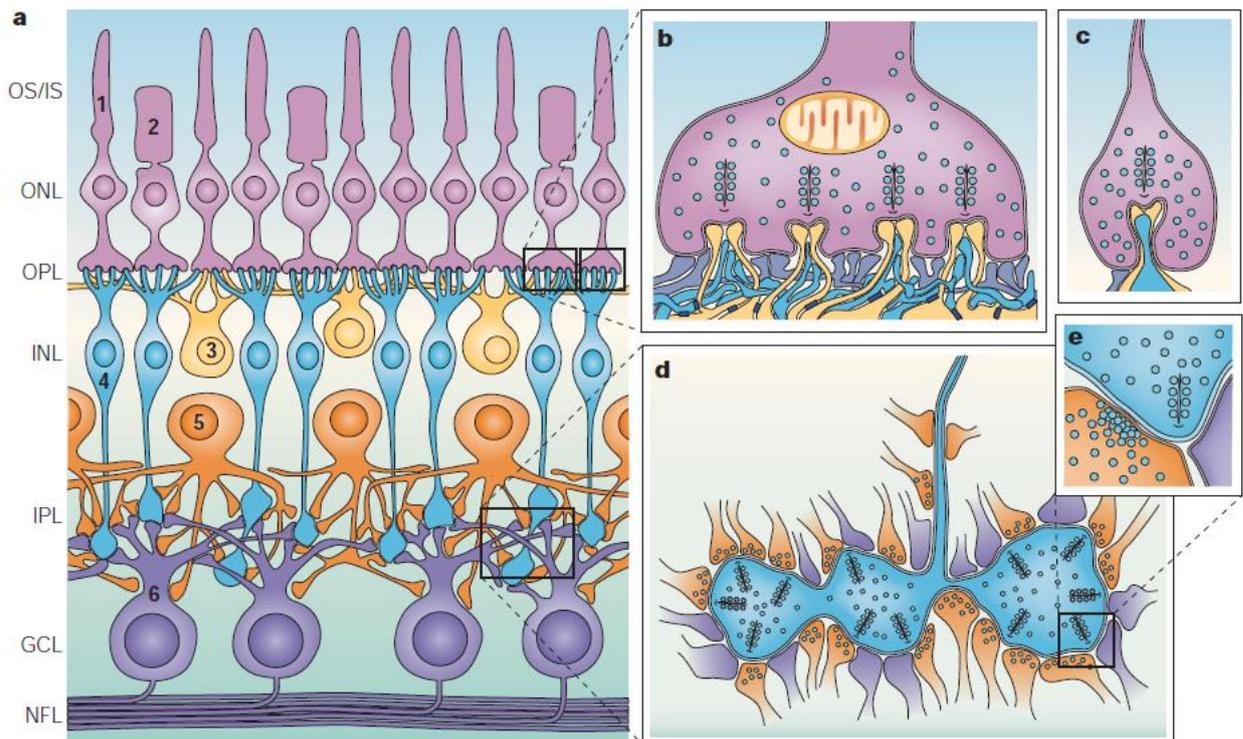


Figura 5. Representação esquemática da retina de mamíferos. Em “a” podemos observar que existem seis tipos de neurônios distribuídos na camada da retina de mamíferos: 1- bastonetes, 2 – cones, 3 – células horizontais, 4 – células bipolares, 5 – células amacrinas, 6 – células ganglionares da retina. Em “b” o esquema representa o pedículo de um cone, o terminal sináptico dos cones, nos quais as sinapses em fitas estão em contraposição aos dendritos de células horizontais (em amarelo) e os dendritos da célula bipolar *ON* (em azul), esse arranjo sináptico é denominado de tríade. Os dendritos das células bipolares *OFF* realizam sinapses com a base do pedículo do cone (em roxo). Em “c” podemos observar a representação esquemática de uma esférula, o terminal sináptico dos bastonetes, na qual a sinapse em fita está em contraposição aos dendritos de células horizontais (em amarelo) e aos dendritos de uma célula bipolar de bastonete (em azul). Dendritos de células bipolares *OFF* de cone realizam contatos na base (roxo). Em “d” podemos observar o terminal axônico de uma célula bipolar de cone (azul), ele contém até 50 fitas pré-sinápticas e se conecta a processos de células amacrinas pós-sinápticas (laranja) e dendritos de células granulares (roxo). Em “e” podemos observar uma visão ampliada de sinapse de fita entre a célula bipolar (em azul), processos de célula amácrina (em laranja) e dendritos da célula ganglionar (em roxo). As células amácrinas realizam sinapses em retroalimentação com as células bipolares. Este arranjo sináptico é denominado de díade. As células amácrinas também realizam numerosas sinapses convencionais com outras células amácrinas e células ganglionares na camada Plexiforme Interna (IPL). Alguns processos de células amácrinas alcançam a OPL e realizam contatos sinápticos (processos interplexiformes). (OS//IS: segmentos externos e internos de cones e bastonetes; ONL: camada nuclear externa; OPL: camada plexiforme externa; INL: camada nuclear interna; IPL: camada plexiforme interna; GCL: camada de células ganglionares; NFL: camada de fibras de nervo óptico). Wässle (2004).

O Eletrorretinograma (ERG) avalia a resposta eletrofisiológica retiniana aos estímulos luminosos (Figura 6). É usado para entender o funcionamento da retina e auxilia no diagnóstico e acompanhamento de várias patologias retinianas. A onda-a se origina dos fotorreceptores e a onda-b da atividade das células bipolares, localizadas na camada nuclear interna (INL). O ERG negativo ocorre quando há uma redução da onda-b sem alteração ou com menor prejuízo da onda-a, o que significa uma razão $b/a \leq 2$. O ERG negativo pode ser encontrado em sujeitos com DMD (Fitzgerald et al., 1994). A alteração do ERG parece estar relacionada à alteração na expressão da proteína Dp260, localizada na camada plexiforme externa da retina.

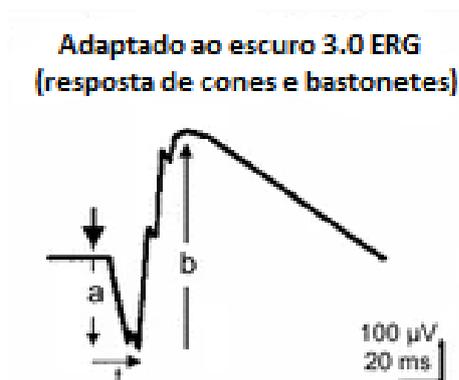


Figura 6. Representação de um ERG clássico definido pela norma da ISCEV. A seta em negrito indica o flash do estímulo, as setas longas representam a amplitude da onda-a e da onda-b e a seta na horizontal (t) representa o tempo em ms. Modificado de McCulloch et al. (2015).

1.3 O SISTEMA VISUAL NA DMD

A retina é sítio de expressão de diferentes isoformas, como a Dp427, Dp260, Dp140 e Dp71 da distrofina. Elas estão na camada plexiforme externa da retina (Pillers et al., 1993), onde ocorrem os contatos sinápticos entre fotorreceptores (cones e bastonetes) e células bipolares e horizontais (Blank, M., et al., 1999; Ueda et al., 1995; Ueda, et al., 1997). A Dp427 é expressa em maior quantidade pelos cones do que pelos bastonetes (Wersinger et al., 2011). A Dp260 e a Dp140 encontram-se na camada plexiforme externa da retina (Ueda, et al., 1997; Ueda, et al., 1997), mas somente a Dp260 apresenta padrões de expressão semelhantes aos dos receptores das células bipolares do tipo mGluR6 durante o período de maturação funcional no desenvolvimento retiniano. Portanto, a Dp260 está envolvida no estabelecimento de conexões sinápticas entre os fotorreceptores e neurônios pós-receptorais (Rodius et al., 1997). Além disso, a Dp260 é a proteína em maior quantidade na camada plexiforme externa da retina, seguida pela Dp140, em menor quantidade temos a Dp427 (Wersinger et al., 2011). Distrofinas também foram encontradas na camada nuclear interna da retina de camundongos, mas não se sabe ao certo quais proteínas seriam expressas pelas células bipolares e/ou células amácrinas e suas funções específicas para o funcionamento retiniano (Wersinger et al., 2011)

A distrofina foi localizada na camada plexiforme externa da retina em humanos na parte invaginada dos bastonetes (Figura 7) (Pillers et al., 1993) e o eletrorretinograma negativo está associado a ausência da distrofina, sendo afetado em pacientes com alterações na Dp260 (Girlanda et al., 1997; Pascual et al., 1998). Outros autores relatam uma piora no resultado do ERG em pacientes com deleções entre os exons 44 e 62 (Ricotti et al., 2016; Schmitz & Drenckhahn, 1997). Estudos realizados no Laboratório da Visão do Instituto de Psicologia da

Universidade de São Paulo (USP), revelaram que as perdas funcionais vão além das encontradas na fisiologia sensorial da retina evidenciada pelo eletrorretinograma. A avaliação da visão de cores mostrou que a Dp260 é um marcador chave das alterações visuais. As alterações encontradas podem estar relacionadas ao processamento pós-receptor para oponência cromática verde-vermelho (Costa, et al. 2007). Também confirmaram a relevância do subsistema *ON* das vias visuais retinianas nas alterações que a distrofina causa em funções visuais cromáticas e espaciais (Barboni et al., 2013).

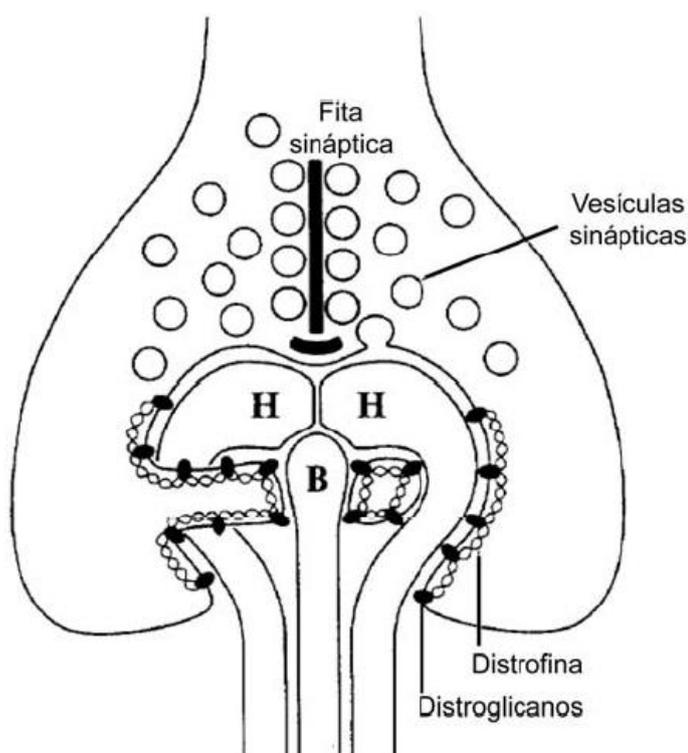


Figura 7. Representação da localização da distrofina e dos distroglicanos na invaginação do complexo sináptico do bastonete. B = dendrito da célula bipolar e H = processo da célula horizontal. Modificado de Schmitz & Drenckhahn, (1997, b).

Miyake e colaboradores (1986), mostraram o eletrorretinograma negativo em pacientes com cegueira noturna estacionária congênita CSNB (do inglês: Congenital Stationary Night Blindness), apresentando um perfil com a onda-a preservada e onda-b reduzida (Miyake et al., 1986). Por outro lado, pacientes com CSNB apresentam alteração na curva de adaptação ao escuro dos bastonetes. Anos depois, o relato de que a medida psicofísica de adaptação ao escuro em pacientes com DMD era normal, foi interpretado como um sinal para diferenciar a CSNB da DMD e durante décadas ficou estabelecido que jovens com DMD apresentavam adaptação ao escuro normal, incompatível com o diagnóstico de CSNB (Jensen et al., 1995). Entretanto,

recentemente, nosso grupo mostrou que pacientes com DMD podem apresentar alteração na adaptação ao escuro (Nagy et al., 2017). Nas figuras 8 e 9 podemos observar as comparações entre sujeitos saudáveis, DMD e CSNB.

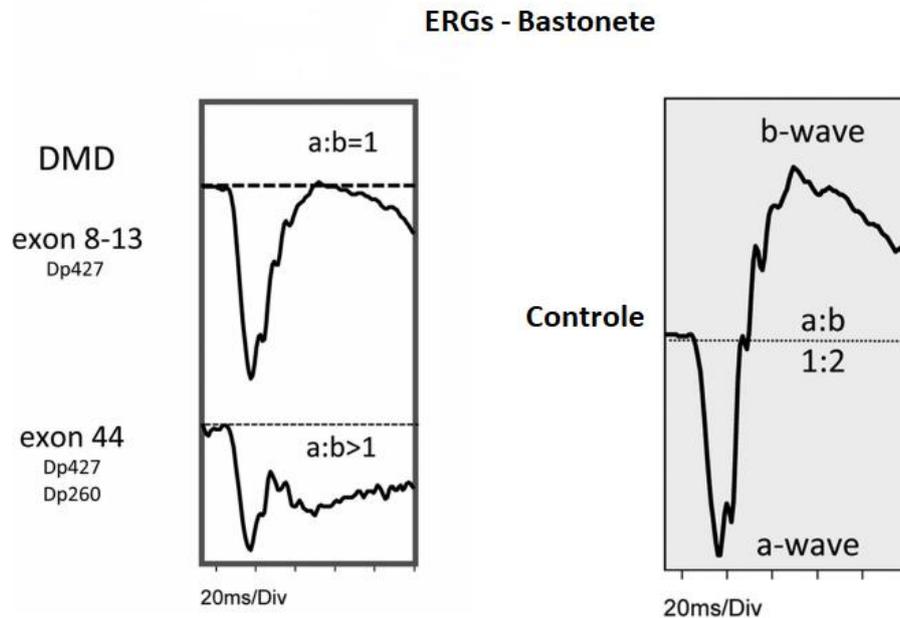


Figura 8. Eletroretinogramas mostram redução da onda-b em pacientes com Duchenne e controle. Foram testados 16 meninos DMDs, 7 meninos com alterações nos exons de 8 a 11 e 9 meninos com alterações no exon 44 ou acima. Modificado de Ricotti, et al. (2016).

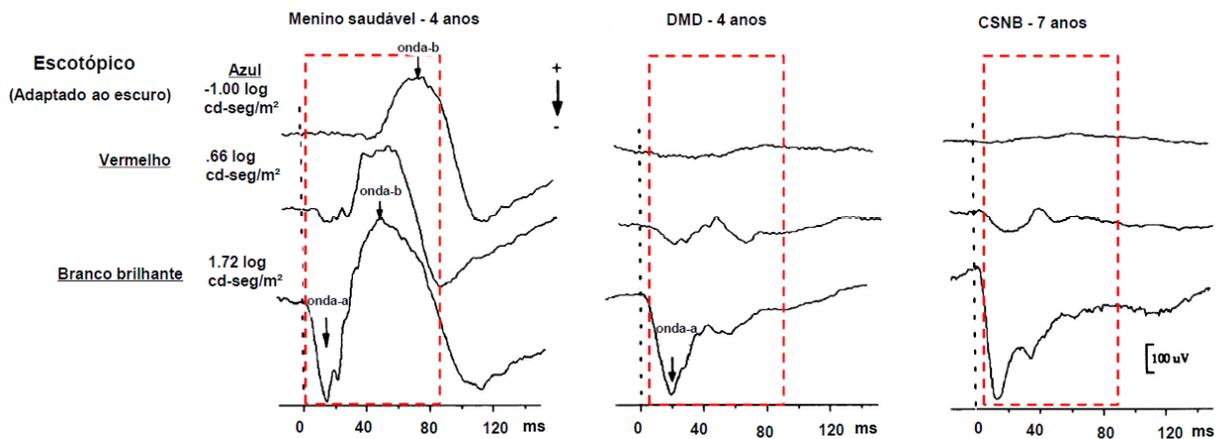


Figura 9. ERGs escotópicos clínicos de indivíduos normais, DMD e CSNB. (DMD) ausência da onda-b para estímulos azul, vermelho e branco em condições de teste escotópico. Apenas as oscilações do cone podem ser vistas na resposta ao estímulo vermelho. A resposta ao flash branco mostra apenas a onda-a. A resposta a um flash branco brilhante mostra apenas a onda fotorreceptora gerada por um fotorreceptor. (CSNB) As respostas escotópicas na CSNB são semelhantes às registradas na DMD, sem contribuição de bastonetes e um ERG negativo a um estímulo branco brilhante. Modificado de Fitzgerald, et al. (1994).

1.4 ADAPTAÇÃO AO ESCURO

A adaptação ao escuro é a mudança na sensibilidade à luz que o olho sofre em baixos níveis de iluminação após exposição à luz (Hecht & Shlaer, 1938). Uma forma de entender a adaptação ao escuro no cotidiano é quando apagamos as luzes para dormir. Inicialmente, nos sentimos em total escuridão e não conseguimos enxergar. Após alguns minutos é possível identificar objetos mesmo com baixa iluminação do ambiente. Esse aumento de sensibilidade à luz após um tempo no escuro tem um curso temporal gradativo em que a sensibilidade aumenta até atingir seu máximo.

Hermann Rudolph Aubert foi um médico fisiologista alemão, que ficou conhecido por trabalhar com psicofísica e foi ele quem introduziu o conceito de adaptação para diferenciar de acomodação, ele fez sua primeira medida de adaptação ao escuro nele próprio em 1865. A primeira medida de adaptação ao escuro foi realizada em outras pessoas foi realizada por Piper em 1903 e confirmada por Nagel em 1911, ainda que de forma incompleta, pois os dados mostravam que a adaptação ao escuro ocorria apenas nos bastonetes (Hecht et al., 1937).

A partir de 1921, Hecht desenvolveu experimentos com adaptação ao escuro medindo limiares foveais, para avaliar a adaptação dos cones. O resultado foi uma rápida adaptação ao escuro conduzida pelos cones, mudando a ideia inicial de Piper sobre a adaptação ao escuro ocorrer apenas nos bastonetes.

Blanchard em 1918 mostrou que a intensidade de exposição prévia à luz modifica o limiar de sensibilidade à luz no tempo zero (início da adaptação ao escuro). A faixa de intensidades de luz percebidas pelos cones e bastonetes durante a adaptação ao escuro dependerá da cor e do tipo de estímulo luminoso (Kohlrausch, 1922, 1931) e da duração e intensidade da luz de exposição prévia (Hecht & Haig, 1936; Muller, 1931; Wald & Clark, 1936; Winsor & Clark, 1936).

A adaptação ao escuro sem exposição prévia a uma luz de intensidade e duração especificadas pode resultar em dados instáveis e duvidosos. Essa exposição destina-se a provocar a separação entre o cromóforo retinal e a rodopsina, tornando-a de coloração mais pálida, razão pela qual é descrita como descoramento (*bleaching*). O descoramento deve ser idêntico entre os sujeitos avaliados para que a adaptação ao escuro possa ser comparável entre eles (Hecht et al., 1937).

Em 10 anos de experiência avaliando o descoramento na adaptação ao escuro, os autores descobriram que a maioria das variações nos dados decorrem da falha em especificar condições de medição. A adaptação dos bastonetes foi descrita de duas formas, uma rápida e outra lenta. A rápida acontece após a utilização de uma luz com baixa intensidade na pré-adaptação ao

escuro e a lenta acontece após uma luz de pré-adaptação com alta intensidade (Hecht et al., 1937).

Além do efeito da intensidade luminosa, outras variáveis que podem afetar a adaptação ao escuro são a duração da luz de pré-adaptação, o tamanho e posição do estímulo na retina, o comprimento de onda da luz de pré-adaptação e a capacidade de regeneração da rodopsina (Kalloniatis & Luu, 2007).

Ao entrar em uma sala escura depois de ficar exposto à luz de um dia ensolarado, o olho fica imediatamente mais sensível à luz. Essa mudança de sensibilidade inicial é rápida, mas depois de 5 minutos no escuro ela ocorre mais lentamente, e após 30 minutos no escuro, a sensibilidade ainda aumenta, porém muito lentamente, até 45 minutos ou 1 hora, quando a sensibilidade máxima é atingida. A sensibilidade final de cada olho em aproximadamente 1 hora no escuro varia entre 5.000 e 10.000 vezes mais sensível que no início da adaptação ao escuro (Charles, 1944; Hecht, 1920a).

A figura 10 apresenta um gráfico com a curva típica de adaptação ao escuro encontrada em 80% dos adultos saudáveis (faixa sombreada), medida com estímulo projetado sobre a retina 20 graus nasal da fóvea. A curva mostra as mudanças dos limiares de detecção de luz medidos com um foco de luz, em função do tempo de permanência do observador no escuro. A curva inicial com pontos vermelhos reflete o mecanismo de adaptação ao escuro dos cones. A sensibilidade dos bastonetes é refletida pela segunda parte da curva de adaptação ao escuro. Embora os bastonetes estejam ativos desde o início da adaptação ao escuro, a sensibilidade inicial é suplantada pela dos cones, que são mais sensíveis no início da adaptação, porém se adaptam rapidamente. A resposta dos bastonetes ocorre desde o início, mas pode ser observada na Figura 10 após a estabilização da adaptação dos cones. A adaptação dos bastonetes é identificada pela melhora de sensibilidade visual após 5-10 minutos de adaptação ao escuro que dá origem ao segundo ramo da curva de adaptação (Kalloniatis & Luu, 2007).

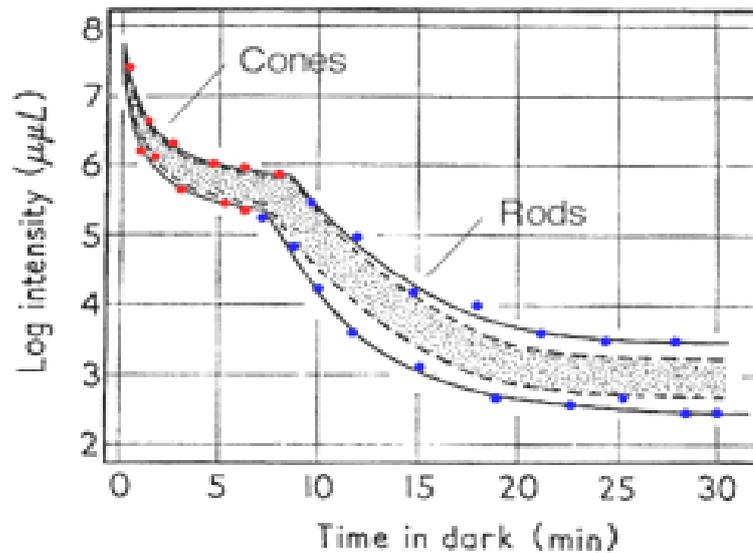


Figura 10. Curva típica de adaptação ao escuro de humanos adultos. Os pontos em vermelho representam a adaptação relacionada aos cones, enquanto que os pontos azuis, são relacionados à adaptação dos bastonetes. A área sombreada representa a faixa de adaptação encontrada em 80% do grupo de indivíduos. Os dados de Hecht e Mandelbaum de De Pirenne M. H., *Dark Adaptation e Night Vision*. Capítulo 5. Em: Davson, H. (ed), *The Eye*, vol 2. London, Academic Press, 1962

Sabe-se, então, que o fenômeno de adaptação ao escuro ocorre na retina e não no cérebro. Pode-se exemplificar essa afirmação com um sujeito com apenas um olho adaptado ao escuro, o descoramento diminui a sensibilidade apenas do olho exposto (Reuter, 2011).

A maioria dos experimentos de adaptação ao escuro não utilizou a dilatação forçada da pupila. No olho humano, o diâmetro da pupila varia entre 2 a 8 mm, durante o experimento completo de adaptação ao escuro, a pupila geralmente altera seu diâmetro cerca de 16 vezes (Dowling, 1987. p.187; Reuter, 2011).

Para descrever o mecanismo de adaptação visual é de extrema importância descrever a rodopsina, uma proteína transmembranar pertencente aos bastonetes, que possui um amplo espectro de absorção, com pico em 505nm (Reuter, 2011).

Durante os anos de 1950, Wald e Hubbard, concluíram que o evento primário da adaptação ao escuro é puramente fotoquímico, na excitação de cones e bastonetes. Também foi descrito que a forma todo trans do retinal não é imediatamente separada da rodopsina. Essa separação ocorre através de uma cadeia de respostas ao descoramento, que foram descritas com base nos espectros de absorção de três produtos: metarodopsina I (pico de absorção em 480nm), meta-II (pico de absorção em 380nm) e meta-III (pico de absorção em 470 nm). A separação do retinol e da opsinina é necessária para a inibição da rodopsina para a opsinina livre e então, um novo 11-cis retinal. Após a separação da opsinina na forma toda trans retinal (pico de absorção

em 380nm), ela é enzimaticamente reduzida em uma toda trans retinol, que é a vitamina A (com pico de absorção em 330nm), transportada até o epitélio pigmentar e convertida em 11-cis-retinal, para logo após voltar para os bastonetes na retina neural. Essa isomerização demonstrou que mudanças puramente estéricas nas interações de uma molécula são capazes de produzir efeitos fisiológicos dramáticos (Reuter, 2011)

Dowling em 1960 demonstrou o paralelismo entre a adaptação ao escuro e a regeneração da rodopsina, o que foi um grande avanço, visto que a adaptação ao escuro pode ser identificada através de alterações bioquímicas. Num estudo em ratos albinos, foi avaliada a recuperação gradual da capacidade de respostas a um flash após 30 minutos de descoramento, medindo as intensidades de luz necessárias para obter um eletrorretinograma (ERG) de tamanho fixo, de pequena amplitude, correspondente ao limiar. Os resultados revelaram que de 3 a 100 minutos no escuro, a sensibilidade aumentou em 3,5 unidades logarítmicas, cerca de 3000 vezes. Em experimentos paralelos foi demonstrado por Dowling e seu grupo que durante o mesmo período a quantidade de rodopsina recuperada aumentou aproximadamente de 4% a 100% do nível de adaptação ao escuro. (Dowling, J. E., 1960; Dowling, J. & Wald, 1958).

Rushton desenvolveu um método engenhoso para medir a regeneração da rodopsina diretamente no olho humano. Esse método consistia em medir a quantidade de luz de um flash que é refletida pela retina. O raciocínio se baseia na ideia de que a rodopsina absorve a luz. Portanto quando ela não está descorada, a maior parte da luz incidente é absorvida e a quantidade refletida é pequena. Por outro lado, quando ela está descorada a capacidade de absorção diminui e a quantidade refletida aumenta. Este método, conhecido como densitometria retiniana por reflexão foi usado para verificar a quantidade de fotopigmento que foi descorado após receber um estímulo luminoso intenso e permitiu concluir que o tempo de adaptação ao escuro e a regeneração da rodopsina era o mesmo, porém este fato não explica completamente o grande aumento da sensibilidade dos bastonetes com o tempo (Kalloniatis & Luu, 2007).

Hecht, Haig e Chase mostraram em 1965 que o descoramento da rodopsina em 1% aumenta o limiar 10 vezes, portanto diminuindo a sensibilidade em 10 vezes, e o descoramento de 50% da rodopsina aumenta o limiar em 10 unidades de log, ou 10.000.000.000 de vezes, enquanto o descoramento de 50% do fotopigmento do cone aumenta o limiar do cone em 1,5 unidades de log. Portanto, embora o curso temporal da regeneração da rodopsina coincida com a curva de adaptação ao escuro, as mudanças de sensibilidade não correspondem às quantidades de rodopsina alteradas pelo descoramento (Kalloniatis & Luu, 2007).

O exame de adaptação ao escuro avalia diretamente as funções dos fotorreceptores por métodos não invasivos. A quantidade de energia necessária para detectar luz é usada para medir

o tempo de recuperação da sensibilidade dos fotorreceptores (cones e bastonetes). A avaliação da adaptação ao escuro é muito importante para estudos e exames clínicos, pois seus resultados podem revelar o progresso de uma determinada doença. A Cegueira Estacionária Noturna Congênita (CSNB), a Degeneração Macular Relacionada à idade (DMRI) e a Retinose Pigmentar são exemplos de doenças nas quais um dos primeiros sintomas é a perda da visão periférica, afetando os bastonetes (Curcio et al., 1996). Portanto esse exame é de extrema importância para detectar esses sintomas forma precoce..

1.4.1 Adaptação ao escuro na Distrofia Muscular de Duchenne

Conforme descrito anteriormente, a alteração na proteína Dp260, cuja expressão é comprometida por alterações no gene *DMD* a partir do exon 30, é necessária para a transmissão sináptica normal entre fotorreceptores, células bipolares e horizontais. Portanto essa alteração genética altera a fisiologia da retina (Drenckhahn et al., 1996; Mehler & Victor, 2000; Pillers et al., 1999).

Medidas anteriores da adaptação ao escuro de pacientes com DMD revelaram resultados dentro da normalidade em sete pacientes avaliados, três dos quais tinham ERG negativo (Tremblay et al., 1994). O resultado normal de adaptação ao escuro em pacientes com DMD não era esperado devido às alterações das respostas eletrofisiológicas dos bastonetes nesses pacientes. A luminância limiar média no final da adaptação ao escuro dos pacientes DMD foi de $-5,5 \pm 0,3$ cd.m² conforme o esperado ($-5,4 \pm 0,3$ cd.m²) (Tremblay et al., 1994). A acuidade visual, a sensibilidade ao contraste, a visão de cores, o campo visual e a adaptação ao escuro estavam dentro da normalidade em um grupo de 16 pacientes com DMD e a Distrofia Muscular de Becker (DMB) (Jensen et al., 1995).

Apenas os dois estudos citados avaliaram a adaptação ao escuro em pacientes com Distrofia Muscular de Duchenne, porém, infelizmente. ambos os artigos não detalharam os métodos utilizados para a realização do exame (Jensen et al., 1995; Tremblay et al., 1994).

Resultados preliminares foram obtidos por nosso grupo com sujeitos DMD, usando um protocolo de adaptação ao escuro que permite avaliação em tempo mais curto que os protocolos clássicos. O novo protocolo testa em duas fases, uma primeira fase de 8 minutos mede a sensibilidade dos cones e o início da quebra para a curva dos bastonetes e após 5 minutos de intervalo é medida a sensibilidade dos bastonetes durante 6 minutos. Nesse protocolo foi demonstrada baixa variabilidade entre os voluntários saudáveis testados (Figura 11) (Nagy et al., 2017). Foram também examinados dois pacientes com DMD. Um deles, com mutação genética *upstream* ao exon 30, afetando apenas a Dp427, apresentou resultados de adaptação

ao escuro semelhante aos dos controles. O outro paciente, com mutação genética *downstream* ao exon 30 e, portanto, com a proteína Dp260 retiniana afetada, mostrou comprometimento da função dos bastonetes, com menor sensibilidade e maior demora no tempo de quebra dos cones/bastonetes (Nagy et al., 2017)..

Embora alterações na adaptação ao escuro não tenham sido descritas nos dois trabalhos publicados sobre o tema, em Jensen et al., (1995) e Tremblay et al., (1994), o estudo de Nagy e colaboradores (2017) mostrou que há alteração na adaptação ao escuro e alterações nos bastonetes quando a Dp260 é afetada.

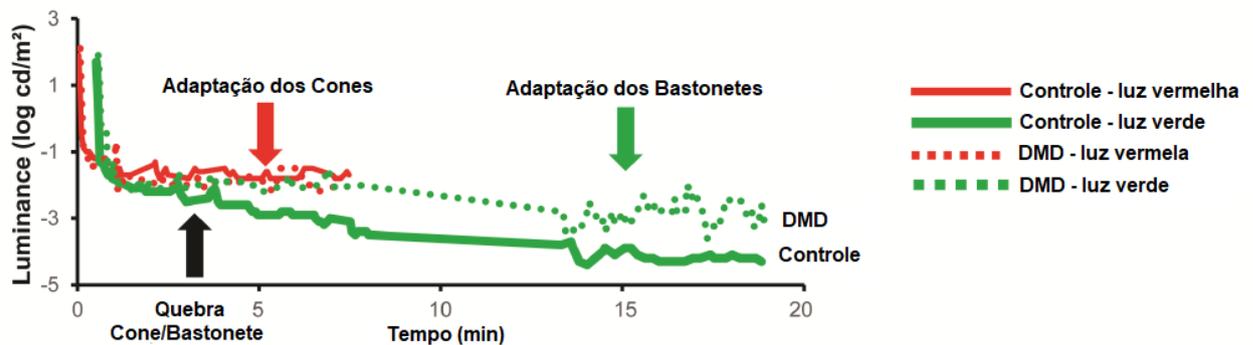


Figura 11. Curvas de adaptação ao escuro mostrando limiar de luminância para a detecção de luz em função do tempo no escuro. As linhas contínuas representam a resposta de um sujeito controle e as linhas pontilhadas representam respostas de pacientes DMD com mutações no exon 48-52. Linhas vermelhas representam a resposta à luz vermelha e linhas verdes representam as respostas à luz verde. Note-se que os limiares foram semelhantes para a luz vermelha, mas nunca foi atingido pelo paciente com DMD o limiar dos bastonetes e também a quebra dos cones entre 3 à 5 minutos. Modificado de Nagy, et al. (2017).

O achado do nosso grupo difere dos relatos do trabalho de Jensen et al., (1995) e Tremblay et al., (1994), nos quais pacientes com DMD apresentaram adaptação normal ao escuro. Entretanto, nosso estudo preliminar não foi conclusivo por se tratar apenas de relato de caso. Portanto, se faz necessária a investigação detalhada da adaptação ao escuro de pacientes com DMD e sua relação com o local de alteração genética. Além disso, uma vez que o local da mutação genética desses pacientes pode ser conhecido e comparado, ao contrário do que era disponível na época dos estudos de Jensen et al., (1995) e Tremblay et al., (1994), o presente trabalho poderá contribuir para o entendimento do papel das proteínas distrofinas na sensibilidade de cones e bastonetes na adaptação ao escuro.

2 JUSTIFICATIVA

A adaptação ao escuro vem ganhando espaço na clínica para o diagnóstico de doenças que inicialmente se manifestam com a perda da visão periférica. Trata-se de um método promissor para investigar a fisiologia da retina e contribuir para diagnósticos precoces de doenças que afetam o sistema nervoso central. O Brasil é carente de grupos que se dedicam a essa área do conhecimento.

Este estudo tem o objetivo de contribuir para o conhecimento dos aspectos funcionais do processamento visual de pacientes com Distrofia Muscular de Duchenne, enfatizando a investigação das características da curva de adaptação ao escuro destes pacientes, função que ainda não foi devidamente investigada e que poderá revelar mais sobre o comprometimento visual relacionado à via dos bastonetes nessa população.

Nossa hipótese é que, uma vez que pacientes com DMD com mutação genética posterior ao exon 30 apresentam respostas escotópicas alteradas no eletrorretinograma, a adaptação ao escuro poderia estar alterada nesses pacientes. Em paralelo ao que ocorre com CSNB, cujo eletrorretinograma (ERG) mostra o mesmo tipo de alteração com perda de amplitude da onda-b, seria de se esperar que a adaptação ao escuro estivesse prejudicada na DMD como está na CSNB. A redução de amplitude da onda-b decorre de prejuízos na comunicação sináptica dos bastonetes com as células bipolares, do tipo *ON*. Para a via dos cones a alteração do ERG é encontrada quando se avaliam as respostas das vias *ON* e *OFF* separadamente. O fenótipo eletrofisiológico da DMD é muito parecido com o da CSNB, cujos pacientes apresentam prejuízos na adaptação ao escuro. Nossa hipótese é que uma disfunção dos bastonetes poderia ser evidenciada ao medir, psicofisicamente, a sensibilidade dos bastonetes adaptados ao escuro.

3 Objetivos

OBJETIVO GERAL

Avaliar possíveis alterações dos limiares de cones e bastonetes adaptados ao escuro relacionadas com mutações no gene *DMD*, em pacientes com DMD.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- o Determinar a sensibilidade dos cones e bastonetes na adaptação ao escuro;
- Analisar se há diferença entre pacientes que possuem diferentes locais de mutação genética, considerando como referência o exon 30, cujo promotor é responsável pela transcrição da distrofina mais abundante na retina, aa Dp260;

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos 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) (em anexo).

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

4.1 PARTICIPANTES

Foram avaliados um total de 76 pacientes, porém apenas 41 foram inseridos na análise dos dados. Dos 35 sujeitos excluídos, 17 eram sujeitos controles, cujos motivos de exclusão foram idade acima da faixa etária estudada e não compreensão ou colaboração para realizar o exame. Os outros 18 pacientes excluídos não compreenderem o exame, tinham catarata ou outras alterações oftalmológicas.

No total 20 pacientes com DMD, com idades médias $13,85 \pm 4,40$; DMD U $n=7$ com idade média $14,00 \pm 6,27$; DMD D $n=9$ com idade média $13,67 \pm 3,12$; DMD Dp71 $n=4$ com idade média 14,00 e 21 controles, com idade média $16,05 \pm 5,95$. (Tabela 2 e 3).

Tabela 2. Média e desvio padrão das idades dos participantes.

	Controle	DMD U	DMD D	DMD Dp71
Média	16,05	14,00	13,67	14
DesvPad	5,95	6,27	3,12	4,24

Tabela 3. Participantes com Distrofia Muscular de Duchenne e controles.

Grupo	ID	Idade	AV	Mutações
CTRL	1	19	20/20	
CTRL	2	26	20/20	
CTRL	3	21	20/20	
CTRL	4	11	20/20	
CTRL	5	17	20/20	
CTRL	6	16	20/20	
CTRL	7	13	20/20	
CTRL	8	23	20/20	
CTRL	9	9	20/20	
CTRL	10	14	20/20	
CTRL	11	17	20/20	
CTRL	12	24	20/20	
CTRL	13	12	20/20	
CTRL	14	23	20/20	
CTRL	15	21	20/20	
CTRL	16	8	20/20	

CTRL	17	8	20/20	
CTRL	18	10	20/20	
CTRL	19	7	20/20	
CTRL	20	16	20/20	
CTRL	21	22	20/20	
DMD U	22	22	20/20	duplicação no exons 3-7
DMD U	23	19	20/20	duplicação no exon 3-7
DMD U	24	20	20/20	mutação de ponto no exon 6
DMD U	25	8	20/20	mutação de ponto no exon 6
DMD U	26	9	20/20	mutação de ponto no exon 7
DMD U	27	7	20/20	mutação de ponto no exon 16
DMD U	28	13	20/20	mutação de ponto no exon 20
DMD D	29	14	20/20	deleção no exon 12-39
DMD D	30	12	20/20	Frameshift* no exon 40
DMD D	31	14	20/20	deleção no exon 45-46
DMD D	32	13	20/20	deleção no exon 45-52
DMD D	33	9	20/20	deleção no exon 45-52
DMD D	34	19	20/20	deleção no exon 47-50
DMD D	35	16	20/20	deleção no exon 48-52
DMD D	36	10	20/20	deleção no exon 49-50
DMD D	37	16	20/20	deleção no exon 52
DMD Dp71	38	12	20/20	mutação de ponto no exon 70
DMD Dp71	39	18	20/20	mutação de ponto no exon 72
DMD Dp71	40	9	20/20	mutação de ponto no exon 74
DMD Dp71	41	17	20/20	mutação de ponto no exon 74

Nota: Av = acuidade visual. ID = identificação do sujeito. *Frameshift é uma mutação genética causada por *indels* (inserção ou deleção) de um número de nucleotídeos em uma sequência de DNA (do inglês: DeoxyriboNucleic acid) que não é divisível por três (ex.: 1, 2, 4, 5, 7, etc.), devido a natureza tripla da expressão do gene por códons, a inserção ou deleção pode alterar o agrupamento dos códons, resultando em uma tradução diferente da original.

Os pacientes foram encaminhados pelo Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco, da Universidade de São Paulo, coordenado pela Dra. Mayana Zatz e pelo Setor de Investigação de Doenças Neuromusculares da Universidade Federal de São Paulo, coordenado pelo Dr. Luis Fernando Grossklauss.

Os controles foram voluntários, membros da equipe do laboratório e familiares. Todos realizaram os exames oftalmológicos seguindo o mesmo protocolo dos pacientes com DMD.

4.2 AVALIAÇÃO OFTALMOLÓGICA

O exame oftalmológico foi realizado por um médico oftalmologista no laboratório antes de iniciarmos os testes psicofísicos, incluiu medida da acuidade visual com a tabela de ETDRS e a observação da transparência do cristalino através do exame de biomicroscopia com lâmpada de fenda. A medida da pressão intraocular, a fundoscopia após dilatação das pupilas, a refração

e a avaliação da motilidade ocular extrínseca foram realizadas no Laboratório da Visão da USP antes da medida do curso temporal da sensibilidade na adaptação ao escuro. 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).

Os critérios de exclusão foram: idade inferior à 8 anos, dificuldade na compreensão das instruções do teste, dificuldade em manter a atenção até o final do teste, diagnóstico de Transtorno do Espectro Autista com dificuldade para compreender as instruções do teste e catarata afetando a acuidade visual.

4.2.1 Avaliação genética

Os pacientes que fazem acompanhamento médico no Centro de Estudos sobre o Genoma Humano e Células-Tronco da Universidade de São Paulo, assim como os que fazem acompanhamento médico na Universidade Federal de São Paulo, possuíam diagnóstico genéticomolecular, obtido pelas respectivas instituições, que especifica o tipo e o local da mutação no gene da *DMD*. Esse resultado foi obtido através da coleta de sangue do paciente, extração do DNA (do inglês: DeoxyriboNucleic acid) e subsequente reação MLPA (do inglês: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification). O resultado permite verificar se há uma deleção ou uma duplicação no gene *DMD*. Dependendo do(s) exon(s) alterado(s) haverá comprometimento na expressão de diferentes isoformas da proteína distrofina.

4.2.2 Avaliação Psicofísica

- Adaptação ao escuro:

Foi utilizado o Adaptômetro (Dark adaptometer, Roland Consult, Brandenburg, Alemanha) para medir os limiares de cones e bastonetes adaptados ao escuro. Os estímulos de luz foram apresentados em um globo (Ganzfeld Q450) (Figura 13) que possui uma mira de fixação de LED vermelho. O sujeito foi orientado a fixar o olhar na mira de fixação durante todo o exame, o estímulo luminoso a ser detectado tinha 2° de diâmetro e foi apresentado a 20° temporalmente, sendo uma luz de LED vermelha com pico em 625 nm para medir a função dos cones e uma luz de LED verde com pico em 527 nm para medir a função dos bastonetes (Figura 12).

A estimulação era iniciada com a luz vermelha e mudava trinta segundos depois para a luz verde, alternando entre as duas cores durante a primeira fase de 8 minutos de medidas (taxa de estímulo = 0,5 Hz temporal e duração do flash = 250 ms). Após cada flash, o observador

tinha 750 ms para pressionar o botão (janela de reação permitida de um segundo). A apresentação dos estímulos seguiu o procedimento de escada simples e assimétrica. Para os flashes vermelhos e verdes, após a detecção de um estímulo, o flash era diminuído em 6 dB (decibéis) e se o observador não notasse o estímulo, o flash aparecia 2 dB mais intenso.

O teste foi aplicado de forma monocular, no olho dominante com a pupila natural (olho não dilatado) e o olho não dominante foi coberto com um oclutor oftalmológico descartável. O paciente foi orientado a permanecer com os olhos abertos, sendo permitido piscar durante todo o protocolo, exceto no intervalo entre os protocolos em que os dois olhos eram cobertos com um oclutor binocular para que o paciente permanecesse por 5 minutos com os olhos fechados para adaptar ao escuro. Em seguida o olho dominante era descoberto e assim iniciado o segundo protocolo.

O protocolo cone/bastonete foi o primeiro a ser realizado. O sujeito foi submetido a uma adaptação ao claro de 1 minuto com luminância de 3000 cd/m^2 e orientado a ficar com os olhos abertos para ser adaptado ao claro corretamente. Logo após, foi iniciada a apresentação de estímulos luminosos de cor vermelha e verde. A intensidade dos estímulos era aumentada até haver detecção pelo paciente. O paciente respondia apertando um botão de resposta toda vez que visualizava o estímulo. Neste primeiro protocolo foi investigado o limiar dos cones e observada a curva de adaptação ao escuro (figura 12). Logo após o paciente era adaptado ao escuro por 5 minutos e em seguida realizava o segundo protocolo no qual era apresentado apenas o estímulo verde, cuja intensidade era variada a fim de se determinar limiares de luminância durante os 6 minutos finais. Este segundo protocolo investigava os limiares dos bastonetes (figura 12). O protocolo teve duração total de 19 minutos e com a explicação inicial totalizava 25 minutos de exame.

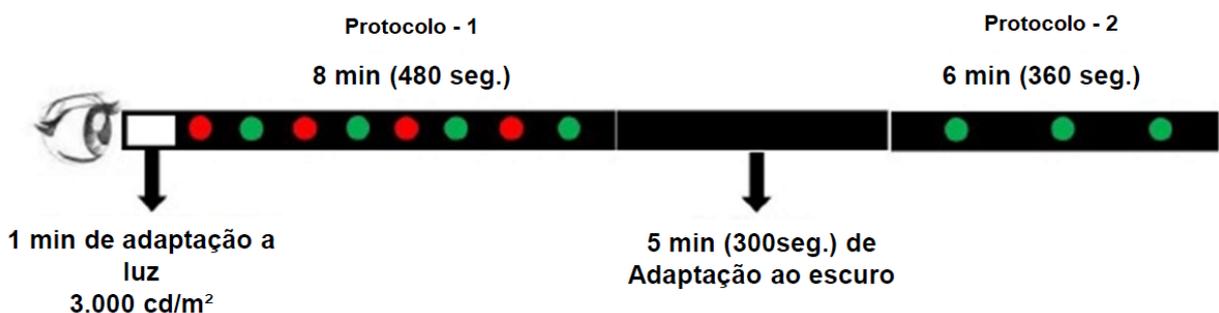


Figura 12. Exemplo gráfico do protocolo aplicado. Sequência de teste: 1) luminância para adaptação ao claro selecionada a partir de níveis de luminância testados $3000 \text{ cd} / \text{m}^2$. 2) Luzes de teste vermelha e verde são apresentadas com a luminância mudando dinamicamente dependendo da resposta do sujeito. 3) Cinco minutos de

adaptação ao escuro. 4) Seis minutos de teste apenas com estimulação com luz verde, iniciando em níveis de luminosidade abaixo do limiar.



Figura 13. Cúpula de estimulação. – Ganzfeld.

Embora o primeiro protocolo tenha 8 minutos e o segundo protocolo 6 minutos, não foi utilizado todo o período para a análise dos dados. Para analisar os cones foram utilizadas as respostas do último minuto do teste e para a análise dos bastonetes foram utilizados apenas os 3 últimos minutos do exame. Assim podemos ter um resultado que considera a média da fase final, estável, das medidas.

4.2.3 Análise dos dados

Foi realizada uma análise para comparar medidas de adaptação ao escuro de cones e bastonetes entre indivíduos de quatro grupos, sendo um grupo controle (voluntários saudáveis) e outros três com Distrofia Muscular de Duchenne. Esses três grupos estão separados por DMD U (pacientes com alterações genéticas que não afetam a Dp260), DMD D (pacientes com alterações que afetam a Dp260) e DMD Dp71 (pacientes com alterações na Dp71).

Inicialmente a pesquisa faria a comparação somente dos grupos: Controle, DMD U e DMD D, porém durante a análise dos dados e resultados observamos que a resposta dos pacientes com alterações na Dp71 apresentava resultados semelhantes ao grupo controle, resolvemos então isolá-lo e trabalharmos com quatro grupos, visto que a Dp71 ainda está sendo estudada para uma melhor compreensão de seu papel.

Para apresentarmos um resultado sem interferências, fizemos a correlação de idade; de gênero; correlacionamos as médias totais dos dois protocolos, de cones e bastonetes; a análise da resposta que cada sujeito apresentou nos três últimos minutos do protocolo para avaliar os bastonetes e no último minuto do protocolo para avaliar os cones; fizemos uma correlação entre pares, ou seja, correlacionamos todos os grupos entre eles.

Para investigar diferenças médias entre os grupos, utilizou-se um modelo de regressão linear misto (ou hierárquico) utilizando variáveis do tipo fatores e variáveis aleatórias. As variáveis aleatórias são variáveis que permitem modelar potenciais de covariâncias entre medidas. Em nosso estudo, foram consideradas cada resposta obtida durante o período analisado do teste, não apenas a média de respostas. São consideradas variáveis de um nível hierárquico superior às medidas individuais, neste caso, a variável aleatória é o próprio indivíduo. Isso é feito, porque, embora o interesse imediato seja no grupo, esperamos que possa haver alguma covariância nos logaritmos obtidos que são em função do fato de terem sido respostas dos mesmos indivíduos e é necessário que este fato seja levado em conta. Em termos menos técnicos, seria como se as diferentes respostas de indivíduos fossem *clusters*, ou subgrupos de si mesmos. Portanto, foi utilizado um modelo linear misto tendo o grupo como fator e o indivíduo como variável aleatória. A comparação de cones e bastonetes foi feita separadamente considerando o número reduzido de indivíduos.

Foi realizado também um teste comparando a média de respostas obtidas durante o teste de cada participante, tanto para cones, como parabastonetes, em função do grupo. Considerando que temos poucos valores, optou-se pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de testes pareados de Mann-Whitney, quando se obteve significância no primeiro. O teste de Mann-Whitney (teste U) é um teste não paramétrico aplicado para duas amostras independentes, sendo correspondente ao teste *t* de *Student*. O teste Kruskal-Wallis se estende ao teste de Mann-Whitney quando há mais de dois grupos, sendo equivalente ao teste F usado na análise de variância de um fator. Esse teste indica que ao menos uma amostra, domina estatisticamente, outra amostra, ele não identifica onde está dominância estatística ocorre ou quantos pares de grupo obtêm dominância estatística.

Para verificar uma possível relação entre a idade do sujeito e o resultado do teste para cones e bastonetes, foram realizados testes de coeficiente de correlação de Pearson, considerando as idades dos participantes e a média de seus resultados, visto que é necessário haver independência das medidas para um teste de correlação. Inicialmente, o teste foi realizado considerando toda a amostra e, em seguida, apenas para o grupo controle. Não foram realizados testes para os demais grupos, em separado, devido ao pequeno tamanho amostral.

Para verificar um potencial efeito de gênero sobre as variáveis estudadas, foram realizadas análises comparando as médias de cones e de bastonetes entre os sexos. Para esta comparação foram utilizados 2 testes *t* de *Student*, um para cada variável. O teste *t* de *Student* é um teste de hipótese que usa conceitos estatísticos, para rejeitar ou não, uma hipótese nula quando a estatística de teste segue uma distribuição *t* de *Student*.

O teste foi utilizado apenas no grupo controle, pois foi o único grupo que apresentava sujeitos do gênero feminino, visto que a DMD afeta apenas sujeitos do sexo masculino, por estar relacionado ao cromossomo X.

5 RESULTADOS

O protocolo experimental adaptado (Nagy et al., 2017) adotado para medir as variações de sensibilidade de cones e bastonetes, foi eficiente na obtenção da curva de adaptação ao escuro. Dos 38 pacientes com DMD testados, 18 não entraram para a pesquisa, sendo que apenas 7 não conseguiram realizar o procedimento, por cansaço (n=2) ou por não entender as instruções (n=5). O restante foi devido a alterações visuais e hiperatividade durante o teste (pacientes com menor idade). Todos os sujeitos controles completaram satisfatoriamente, o procedimento sem nenhum tipo de problema.

5.1 ANÁLISE DA IDADE DOS PARTICIPANTES

Foi realizada a análise do coeficiente da correlação de Pearson (tabela 4) com a amostra total, ou seja, todos os quarenta e um sujeitos relacionando suas idades com seus resultados e um coeficiente de correlação de Pearson entre a idade e cones e também bastonetes. A partir dessa relação podemos observar que não foi observado associação significativa entre a idade de todos os grupos e suas respostas nos dois protocolos.

Tabela 4. Correlação de idade da amostra total através na análise de Pearson.

	Correlação	Idade
Cones	r	0,19
	p	0,23
Bastonetes	r	-0,16
	p	0,32

Quando realizados os testes de correlação apenas para o grupo controle (tabela 5), também não foram observados efeitos de correlação entre as idades e os valores de cones ou bastonetes. Contudo, foi identificada uma tendência de associação negativa entre a idade e os limiares dos bastonetes ($p = 0,09$).

Tabela 5. Correlação de idade apenas no grupo controle.

	Correlação	Idade
Cones	r	-0,06
	p	0,81
Bastonetes	r	-0,38
	p	0,09

5.2 ANÁLISE DE SEXO

A distribuição dos sexos masculino e feminino na amostra foi equivalente para o grupo controle, o que permitiu comparar os dados com os dos pacientes, cujo grupo é composto por

sujeitos do sexo masculino. Como pode ser observado na (tabela 6), nenhum efeito foi detectado a 5% e logo abaixo, a figura 14 representando as diferenças dos dois grupos nos dois protocolos. Sendo assim, não há diferença estatística nas respostas entre os gêneros.

Tabela 6. A tabela abaixo indica as médias entre os sexos e os resultados do teste *t* de Student.

Variável	sexo	Média	DesvPad	t	gl	valor p
Cones	Feminino	-1,78	0,64	-0,77	17,00	0,45
	Masculino	-1,59	0,33			
Bastonetes	Feminino	-4,20	0,28	0,13	17,00	0,90
	Masculino	-4,22	0,27			

gl = graus de liberdade.

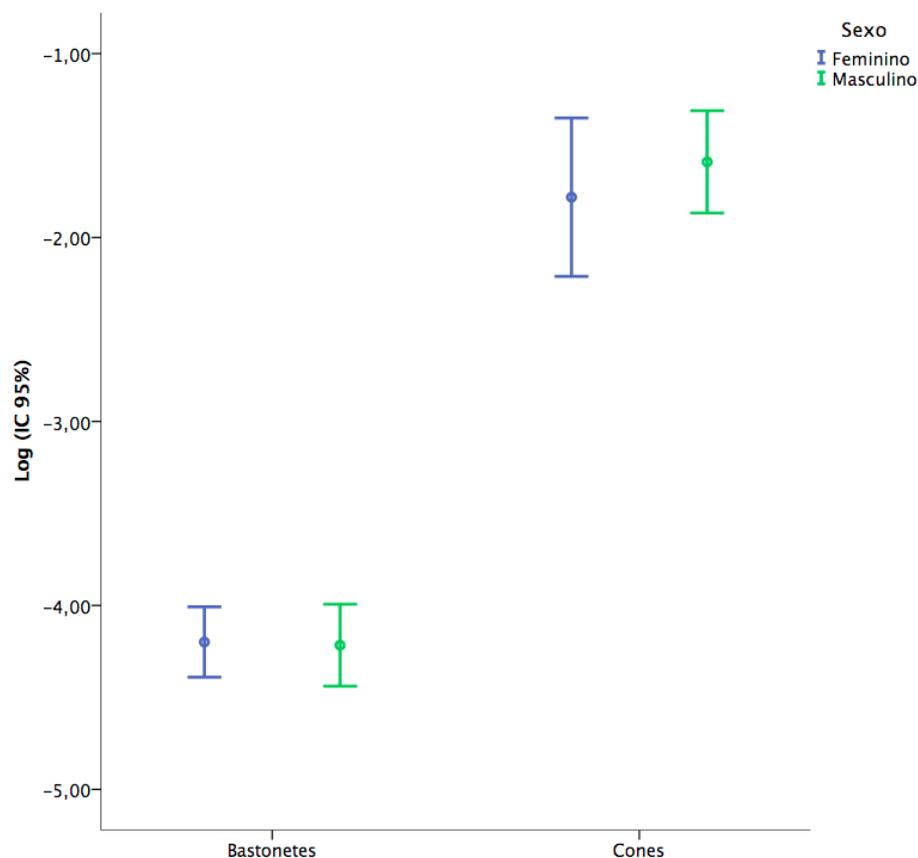


Figura 14. Gráfico da correlação de sexo apenas no grupo controle. No eixo Y representa o log em cd/m^2 e no eixo X os dois protocolos, dos bastonetes e dos cones nos dois grupos (sexo), feminino representado em azul e masculino representado em verde. IC=Intervalo de confiança.

5.3 RESULTADO DOS CONES

A (tabela 7) apresenta a média total e desvio padrão dos limiares obtidos no último minuto do protocolo dos cones,, nos quatro grupos.

Tabela 7. Limiares de Luminância dos Cones.

Grupos	N° de sujeitos	Média	Média DesvPad
CTRL	21	-1,68	0,35
DMD U	7	-1,79	0,63
DMD D	9	-1,95	0,7
DMD Dp71	4	-2,34	0,35

Os limiares não revelaram diferença estatisticamente significante (tabela 8), $F_{(3,38)} = 0,797$ e $p = 0,503$. De fato, olhando os valores médios, apenas o grupo DMD Dp71 pareceu ter médias mais baixas, mas o intervalo de confiança (IC) foi relativamente grande. Uma hipótese é que o IC grande se deve ao menor número de medidas por indivíduo comparado aos bastonetes.

Tabela 8. Média das respostas dos Cones estimado pelo modelo linear misto.

Grupo	Média	gl	IC (95%)	
			Min	Max
CTRL	-1,68	39,09	-2,07	-1,29
DMD U	-1,80	37,77	-2,47	-1,13
DMD D	-1,98	38,71	-2,57	-1,38
DMD Dp71	-2,28	38,56	-3,28	-1,49

gl = graus de liberdade; IC – intervalo de confiança; Min – mínimo; Max = máximo.

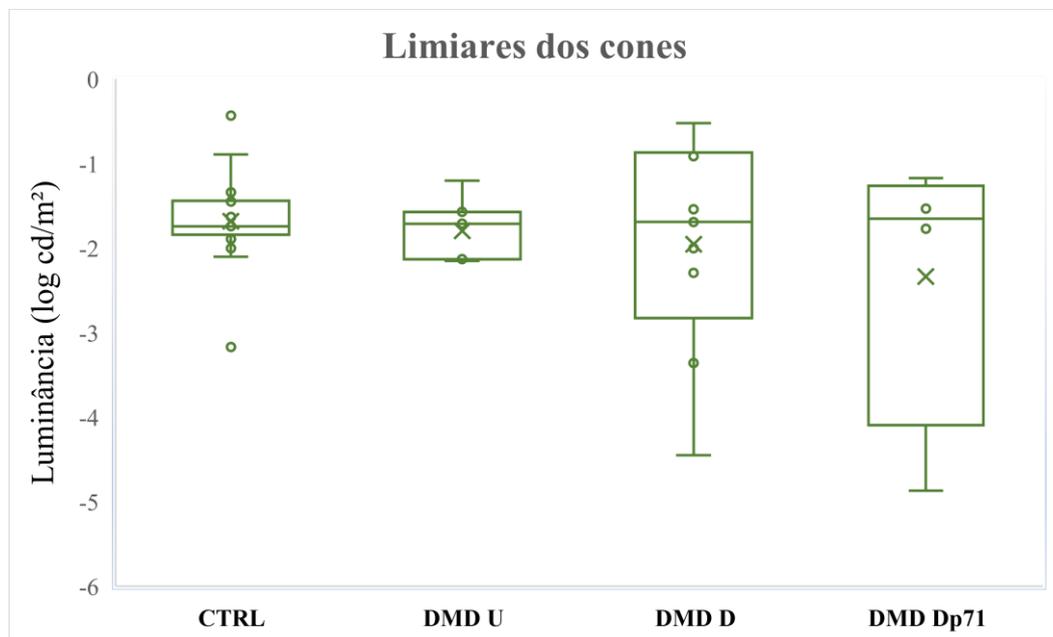


Figura 15. Limiares de luminância dos cones. Box plots mostrando os limiares de luminância em $\log \text{cd/m}^2$ para os quatro grupos (CTRL; DMD U; DMD D; DMD Dp71) no protocolo dos cones a partir das médias individuais de cada sujeito. Os pontos representam a média de cada indivíduo e o "x" representa a média do grupo..

Portanto podemos observar que não houve diferença estatística entre os quatro grupos, embora o grupo Dp71, tenha apresentado seus limiares mais baixos, e um intervalo de confiança mais alto, uma hipótese é por se tratar de um grupo pequeno.

5.4 RESULTADO DOS BASTONETES

A tabela 9 apresenta à média total de tentativas dos últimos três minutos do protocolo dos bastonetes.

Tabela9. Limianes de luminância para os bastonetes.

Grupos	N° de sujeitos	Média Log	Média DesvPad	DesvPad da Média
CTRL	21	-4,21	0,25	0,26
DMD U	7	-3,84	0,47	0,57
DMD D	9	-3,17	0,41	1,13
DMD Dp71	4	-4,01	0,3	0,16

A análise para limiares de luminância dos bastonetes indicou um efeito do grupo, $F_{(3,37)} = 6,313$ e $p < 0,001$. A fim de verificar a natureza do efeito, foram feitas comparações aos pares. As comparações aos pares indicaram que o efeito era apenas em relação ao grupo DMD D, que obteve valores maiores do que os outros três grupos. A comparação com o grupo controle obteve um $p < 0,001$, com o DMD U $p = 0,033$ e com o DMD Dp71 $p = 0,026$. É importante salientar que as comparações aos pares foram feitas sem correção do nível de significância para comparações múltiplas. Essa escolha se deu pelo reduzido número de indivíduos em alguns dos grupos e, utilizando-se a correção, aumentaríamos em muito a chance de um erro tipo II. A tabela 10 indica as médias estimadas pelo modelo utilizado para os diferentes grupos, com seus respectivos intervalos de confiança.

Tabela 0. Média dos limiares dos bastonetes estimadas pelo modelo misto.

Grupo	Média em cd/m²	Gl	IC (95%)	
			Min	Max
CTRL	-4,21	37,01	-4,48	-3,94
DMD U	-3,84	37,18	-4,30	-3,38
DMD D	-3,17	37,01	-3,58	-2,76
DMD Dp71	-4,01	37,03	-4,62	-3,40

IC = intervalo de confiança; Gl = graus de liberdade; Min = mínimo; Max = máximo.

É preciso que se atente, contudo, ao fato de que houve grande variação individual, que foi responsável por cerca de 72,5% da variância dos dados e essa variabilidade pode ser vista principalmente nos grupos DMD D e DMD U.

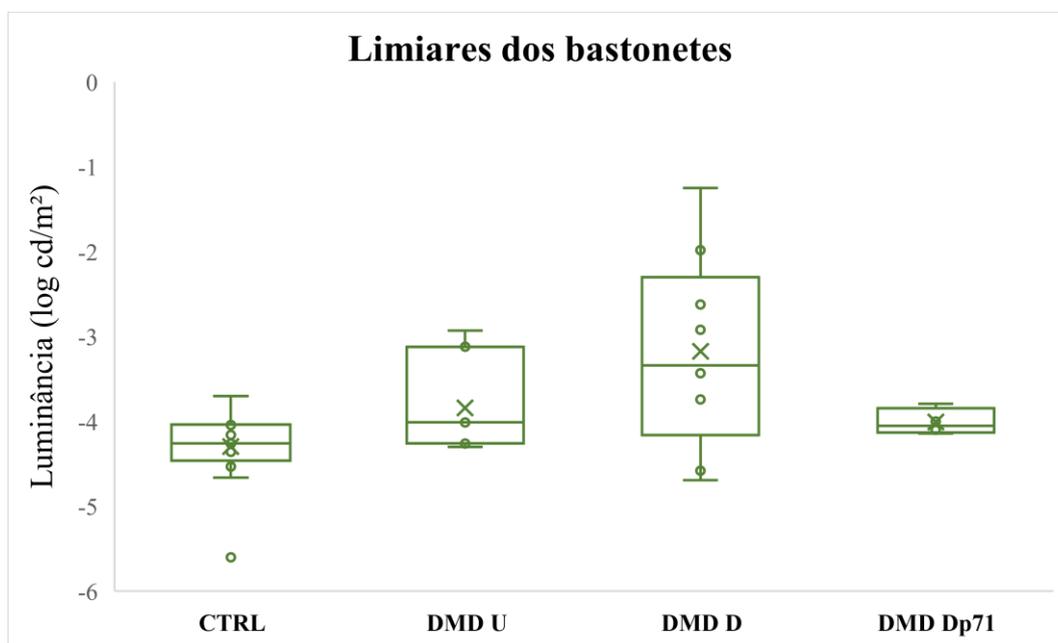


Figura 16. Limiars de luminância dos bastonetes. Box plots mostrando os limiars de luminância em log cd/m² para os quatro grupos (CTRL; DMD U; DMD D; DMD Dp71) no protocolo dos bastonetes a partir das médias individuais de cada sujeito. Os pontos representam a média de cada indivíduo e o “x” representa a média do grupo.

Os testes de Kruskal-Wallis (anexo) não indicaram efeito de grupo nos valores dos cones, $H = 0,284$ e $p = 0,963$. Contudo, foi observado um efeito de grupo em relação aos bastonetes, $H = 8,253$ e $p = 0,041$. A comparação aos pares através do teste Mann-Whitney, indicou haver apenas uma diferença entre os limiars dos bastonetes e os de grupo controle e o DMD D, mesmo após a correção do nível de significância para comparações múltiplas.

Na Análise de Mann-Whitney os grupos foram comparados aos pares (tabela 11). Podemos observar que dentre todas as comparações, a correlação entre o grupo controle e o grupo DMD D (*downstream*) apresentam resultados estatisticamente diferentes com $p=0,04$, demonstrando, então que os pacientes DMD D apresentam uma alteração na resposta dos bastonetes.

Tabela 1. Comparação entre os grupos pelo teste de Mann-Whitney.

Amostra 1 - Amostra 2	Estatística		p ajustado
	de teste	p	
CTRL - DMD U	7,24	0,17	1,00
CTRL - DMD Dp71	7,88	0,23	1,00
CTRL - DMD D	13,10	0,01	*0,04

DMD U - DMD Dp71	0,64	0,93	1,00
DMD U - DMD D	5,87	0,33	1,00
DMD Dp71 - DMD D	5,22	0,47	1,00

*Cada linha testa a hipótese nula de que as distribuições das amostras 1 e 2 sejam iguais. Significações assintóticas (testes de 2 lados) são exibidas. O valor de significância é 0,05

6 DISCUSSÃO

O exame de adaptação ao escuro é utilizada, além de pesquisa como teste clínico oftalmológico para a identificação de sinais subclínicos de doenças que afetam o sistema nervoso central, particularmente doenças da retina que afetam primariamente ou mais severamente regiões extra foveais e, portanto, podem estar associadas com acuidade visual normal. Especificamente, a adaptação ao escuro encontra-se alterada em pacientes com degeneração macular relacionada à idade em estágios iniciais da doença (Flamendorf et al., 2015; Jackson et al., 2014).

No presente estudo, mostramos que pacientes com mutações genéticas que afetam a expressão da proteína distrofina Dp260 (distrofina presente na retina), os limiares dos bastonetes após o fotodescoramento e adaptação ao escuro encontra-se elevados em pacientes DMD *downstream* ao exon30, em comparação com pacientes DMD *upstream* ao exon30, que possuem a expressão da Dp260 preservada e voluntários saudáveis. Estudos anteriores revelaram que a adaptação ao escuro estava preservada em pacientes com DMD. Estudos já revelaram que as alterações genéticas no gene *DMD* humano estão associadas a distúrbios no sistema visual, como foi demonstrado há muito tempo com ERGs (Cibis et al., 1993; Pillers et al., 1993). O presente estudo também oferece novos *insights* sobre a relação a função de cones e bastonetes nas diferenças mutações nas proteínas DMDs, sendo que pacientes com alterações na Dp71, que é a menor isoforma (distal), não apresentaram alterações significativas na sensibilidade dos bastonetes e como essas alterações se refletem na adaptação ao escuro.

Limiars visuais adaptados ao escuro são usados há muito tempo para avaliar função dos fotorreceptores em humanos, fornecendo informações valiosas sobre os mecanismos moleculares subjacentes à fototransdução (Hecht, 1920b, 1921; Hecht et al., 1935; Hecht & Mandelbaum, 1940). Os limiares de cones e bastonetes adaptados ao escuro após o fotodescoramento dependem principalmente de mecanismos fotoquímicos (Dowling, J.E., 1960; Lamb & Pugh, 2004), com o sistema pós-receptorial preservado (Leibrock et al., 1998). Por exemplo, após um período curto de fotodescoramento (menos de 1 minuto), a sensibilidade da célula bipolar se recupera de maneira semelhante aos limiares dos bastonetes adaptados ao escuro (Cameron et al., 2006). Isso significa que a comunicação sináptica adequada entre os fotorreceptores e as células bipolares é necessária para a recuperação do limiar visual adaptado ao escuro após a exposição ao fotodescoramento. Os presentes resultados mostram que as alterações do gene *DMD*, que presumidamente, afetam a expressão da proteína distrofina Dp260 (DMD D) estão associadas com a elevação do limiar ou perda de sensibilidade dos bastonetes adaptados ao escuro.

Sintomas mais próximos a este, com os limiares dos bastonetes mais altos cerca de 3 unidades logarítmicas são observadas em pacientes com o tipo completo de cegueira noturna estacionária congênita (CSNB ou CSNB1). Os autores argumentaram que os sintomas visuais podem não ser percebidos pela maioria dos pacientes com CSNB, pois a visão piora apenas em circunstâncias muito escuras e atualmente não temos mais essa experiência de uma visão totalmente escura, como por exemplo, no campo à noite. Os fenótipos DMD e CSNB no ERG são semelhantes: os pacientes com CSNB apresentam ERG escotópico negativo entre fotorreceptores e células bipolares e resposta adaptada à luz relativamente preservada (Carr, 1974; Miyake et al., 1986; Zeitz et al., 2015). Conforme demonstrados nesse estudo, a função dos cones é preservada e a dos bastonetes alterada mostrou a discrepância entre nossos resultados e os resultados relatados anteriormente (Jensen et al., 1995; Tremblay et al., 1994). Estas discrepâncias podem ser devidas a diferenças metodológicas para o registro de limiares de adaptação ao escuro. Medimos os limiares da adaptação ao escuro nos cones com a luz vermelha e dos bastonetes com a luz verde, durante o curso temporal da adaptação ao escuro. Nosso exame foi limitado a 20 minutos devido às limitações motoras e cognitivas dos grupos de DMD. Pode-se argumentar, que as limitações motoras e cognitivas em vez dos déficits perceptuais, foram responsáveis pelos limiares alterados adaptados ao escuro. No entanto, como os limiares dos cones de todo o grupo de DMD não foram diferentes do grupo controle, a nossa hipótese é de que o resultado dos bastonetes é causado por déficits sensoriais e não cognitivos.

Reconhecemos que nosso protocolo para medir os limiares de cone e bastonetes adaptados ao escuro é uma versão curta (adaptada) do protocolo originalmente utilizado (40 minutos) que desenvolvemos como uma tentativa de tornar o exame tolerável pelos pacientes e voluntários.

Contudo, podemos identificar que foi confirmada nossa hipótese de que o grupo DMD D (com mutação na Dp260) tem um prejuízo na função dos bastonetes comparado aos controles (voluntários saudáveis), mostrando estatisticamente com $P=0,04$. Esse resultado difere de todos os achados anteriores que não revelaram alterações nos bastonetes em pacientes com mutações na Dp260.

A Dp71 é o menor produto do gene *DMD*, expresso no sistema nervoso central (Rapaport et al., 1993). Na retina, ela é expressa pelas células gliais de Muller (MGCs) na membrana limitante interna (MLI) e pelos astrócitos nos vasos sanguíneos (Austin et al., 2000).

Estudos recentes do nosso grupo, realizados na França com eletrorretinograma ERG em camundongos geneticamente modificados, que não apresentava Dp71, foi realizada terapia gênica para restaurar a função da Dp71, com auxílio de um vírus adeno-associado (VAA)

ShH10-GFP para tendo como alvo as células gliais de Müller (MGCs). Os camundongos Dp71 geneticamente modificados, apresentavam uma redução na onda-b no ERG escotópico e fotópico antes da terapia, após 3 meses de tratamento com o ShH10-GFP-2A-Dp71 VAA as respostas no ERG foram totalmente recuperadas nos camundongos anteriormente modificado geneticamente com a extração da Dp71. O resultado desse estudo apresentou a recuperação bem sucedida da reexpressão da Dp71, o que é um grande avanço para futuras terapias gênicas, uma vez que conseguiram normalizar a função da Dp71 (Barboni et al., 2020).

Os papéis que a Dp71 desempenha na retina são ainda desconhecidos. Em pacientes com deleção da Dp71 estão também alteradas as isoformas precedentes, a saber: Dp427, Dp260, Dp140 e Dp71. É intrigante o fato de encontrarmos perda de sensibilidade dos bastonetes para deleção da Dp 260 (que inclui a Dp427) mas não para a Dp71 (que inclui as anteriores). Este achado foi confirmado nos quatro pacientes com essa configuração genética. Entretanto, este é ainda um número pequeno de pacientes, o que nos leva a planejar uma ampliação do estudo nesse particular para testar um número mais elevado de pacientes com essa mutação, bem mais rara que as outras. O fato da ausência da Dp71 anular o efeito deletério da ausência da Dp260 pressupõe uma ligação compensatória entre as duas isoformas. Nesse caso, quando apenas a Dp260 é afetada, a presença da Dp71 deve ter um efeito inibitório. Mas quando ambas são afetadas este efeito inibitório é suprimido e a função não é prejudicada. Ou seja, se ambas estão presentes ou se ambas estão ausentes, a função é normal. Mas se uma está ausente, e a outra presente, a função é afetada. Este achado mostra uma relação antes insuspeitada entre as isoformas.

Visto que identificamos normalidade na adaptação ao escuro em pacientes com alterações na Dp71, um próximo projeto irá investigar a adaptação ao escuro dos cones e bastonetes utilizando o mesmo teste psicofísico de adaptação ao escuro em pacientes com a Dp71 alterada para compreender os feitos de mutações raras que afetam a expressão da Dp71, ainda pouco estudada, aplicar o ERG escotópico e realizar outras medições. Esse próximo projeto irá investigar a adaptação ao escuro dos cones e bastonetes utilizando um teste psicofísico para compreender melhor sobre esses pacientes com essa mutação rara que ainda é pouco estudada.

7 CONCLUSÃO

Pacientes com alterações na Dp260 (DMD D) apresentam uma sensibilidade reduzida dos bastonetes em relação aos controles nos dois testes aplicados, sendo $p < 0,001$ no modelo linear misto (ou hierárquico) e $p = 0,04$ na análise de Mann-Whitney. Nos demais grupos (DMD U e DMD Dp71) não foi possível identificar alterações significativas na sensibilidade dos bastonetes comparados ao grupo controle. Na análise da sensibilidade dos cones não foi possível identificar diferença estatística entre os grupos DMDs (DMD U, DMD D e DMD Dp71). Nos pacientes com alterações na Dp71 os limiares foram mais baixos, porém o intervalo de confiança foi alto e não houve diferença estatística, o que pode ser devido ao fato de que foram avaliados poucos sujeitos. Destaca-se os fatos de que o grupo DMD Dp71 não diferiu do grupo controle na sensibilidade dos bastonetes apesar de sua alteração genética incluir deleção da Dp260.

Nossa hipótese de que há um prejuízo na adaptação ao escuro em pacientes com mutações na Dp260 se confirma nesse estudo, revelando que esses pacientes possuem uma alteração na função dos bastonetes, devido a ausência da distrofina e esse estudo difere dos estudos anteriores que revelaram não apresentarem prejuízos.

A média da adaptação ao escuro, como visto ao longo do texto pode ser utilizada como um biomarcador para doenças que envolvem a retina.

REFERÊNCIAS

- Austin, R. C., Morris, G. E., Howard, P. L., Klamut, H. J., & Ray, P. N. (2000). Expression and synthesis of alternatively spliced variants of Dp71 in adult human brain. *Neuromuscular Disorders*, *10*(3), 187–193. [https://doi.org/10.1016/S0960-8966\(99\)00105-4](https://doi.org/10.1016/S0960-8966(99)00105-4)
- 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*(2), 557–560. <https://doi.org/10.1042/bj2720557>
- Barboni, M. T. S., Vaillend, C., Joachimsthaler, A., Liber, A. M. P., Khabou, H., Roux, M. J., Vacca, O., Vignaud, L., Dalkara, D., Guillonneau, X., Ventura, D. F., Rendon, A., & Kremers, J. (2020). Rescue of defective electroretinographic responses in Dp71-null mice with AAV-mediated reexpression of DP71. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *61*(2). <https://doi.org/10.1167/iovs.61.2.11>
- 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*(2), 291–329. <https://doi.org/10.1152/physrev.00028.2001>
- Blank, M., Koulen, P., & Kroger, S. (1997). Subcellular concentration of betadystroglycan in photoreceptors and glial cells of the chick retina. *Journal of Comparative Neurology*, *668*–678.
- Blank, Martina, Koulen, P., Blake, D. J., & Kröger, S. (1999). Dystrophin and beta-dystroglycan in photoreceptor terminals from normal and mdx3Cv mouse retinæ. *European Journal of Neuroscience*, *11*(6), 2121–2133. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1999.00636.x>
- Buck, S. L. (2003). Rod-cone interactions in human vision. In *The visual neurosciences* (pp. 863–878).
- Burns, M. E., & Lamb, T. D. (2003). Visual transduction by rod and cone photoreceptors. In *The visual neurosciences* (pp. 215–233).
- Byers, T. J., Lidov, H. G. W., & Kunkel, L. M. (1993). An alternative dystrophin transcript specific to peripheral nerve. *Nature Genetics*, *4*, 77–81. <https://doi.org/10.1038/ng0593-77>
- Cameron, A. M., Mahroo, O. A. R., & Lamb, T. D. (2006). Dark adaptation of human rod bipolar cells measured from the b-wave of the scotopic electroretinogram. *Journal of Physiology*, *575*(2), 507–526. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.108027>
- Carr, R. E. (1974). Congenital Stationary Nightblindness. *Transactions of the American Ophthalmological Society*, *72*, 448–487.
- Charles, S. (1944). Dark Adaptation: Some Physical, Physiological, Clinical, and Aeromedical Considerations*. *Journal of the Optical Society of America*, *34*(8), 464–508.

- 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 and Visual Science*, *34*(13), 3646–3652.
- Costa, M. F., Oliveira, A. G. F., Feitosa-Santana, C., Zatz, M., & Ventura, D. F. (2007). Red-Green Color Vision Impairment in Duchenne Muscular Dystrophy. *American Journal of Human Genetics*, *80*(6), 1064–1075.
- Costa, M. F., Barboni, M. T. S., & Ventura, D. F. (2011). Psychophysical measurements of luminance and chromatic spatial and temporal contrast sensitivity in Duchenne muscular dystrophy. *Psychol. Amp Neurosci.* *4*, 67–74.
- Curcio, C. A., Medeiros, N. E., & Millican, C. L. (1996). Photoreceptor loss in age-related macular degeneration. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *37*(7), 1236–1249.
- 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. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *4*(5), 837–842. <https://doi.org/10.1093/hmg/4.5.837>
- Dancey, 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. <https://doi.org/10.1038/nature03387>
- Davson, H. (1980). Retinal structure and organization. In *Physiology of the Eye* (4th E., pp. 167–177).
- Dowling, J. E. (1960). Chemistry of visual adaptation in the rat. *Nature*, *188*(4745), 114–118.
- Dowling, J. E. (1987). The retina: An approachable part of the brain. *The Belknap Press Cambridge*, 1–282.
- Dowling, J., & Wald, G. (1958). Vitamin A Deficiency and Night Blindness. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *44*(7), 648–661.
- Drenckhahn, D., Holbach, M., Ness, W., Schmitz, F., & Anderson, L. V. B. (1996). Dystrophin and the dystrophin-associated glycoprotein, β -dystroglycan, co-localize in photoreceptor synaptic complexes of the human retina. *Neuroscience*, *73*(2), 605–612. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(96\)00069-3](https://doi.org/10.1016/0306-4522(96)00069-3)
- Emery, A. E. H. (1980). Duchenne muscular dystrophy: genetics aspects, carrier detection and antenatal diagnosis. *Br Med Bull*, *36*, 117–122.
- Emery, Alan E. H., Muntoni, F., & Quinlivan, R. C. M. (2015). *Duchenne Muscular Dystrophy* (4 ed.). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/med/9780199681488.001.0001>
- 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. *Journal of Clinical Investigation*, *93*(6), 2425–2430. <https://doi.org/10.1172/JCI117250>

- Flamendorf, J., Agrón, E., Wong, W. T., Thompson, D., Wiley, H. E., Doss, E. L., Al-Holou, S., Ferris, F. L., Chew, E. Y., & Cukras, C. (2015). Impairments in dark adaptation are associated with age-related macular degeneration severity and reticular pseudodrusen. *Ophthalmology*, *122*(10), 2053–2062. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2015.06.023>
- Girlanda, P., Quartarone, A., Buceti, R., Sinicropi, S., Macaione, V., & Saad, F. A. (1997). Extra-muscle involvement in dystrophinopathies: an electroretinography and evoked potential study. *Journal of the Neurological Sciences*, *146*, 127–132.
- Goldstein, E. B. (1970). Cone pigment regeneration in the isolated frog retina. *Vision Research*, *10*(10), 1065–1068. [https://doi.org/10.1016/0042-6989\(70\)90082-9](https://doi.org/10.1016/0042-6989(70)90082-9)
- Hecht, S. (1920a). The dark adaptation of the human eye. *O Jornal de Fisiologia*, 499–517.
- Hecht, S. (1920b). The dark adaptation of the human eye. *The Journal of General Physiology*, 1–19. <https://doi.org/10.1128/mBio.00227-10.Editor>
- Hecht, S. (1921). The nature fovea dark adaptation. *The Journal of General Physiology*, 113–139.
- Hecht, S., & Haig, C. (1936). Dark adaptation as influenced by intensity of light adaptation. *J. Opt. Soc. America*, *26*, 304.
- Hecht, S., Haig, C., & Chase, A. M. (1937). The influence of light adaptation on subsequent dark adaptation of the eye. *Journal of General Physiology*, *20*(6), 831–850. <https://doi.org/10.1085/jgp.20.6.831>
- Hecht, S., Haig, C., & Wald, G. (1935). The dark adaptation of retinal fields of different size and location. *Journal of General Physiology*, *19*(2), 321–337. <https://doi.org/10.1085/jgp.19.2.321>
- Hecht, S., & Mandelbaum, J. (1940). DARK ADAPTATION AND EXPERIMENTAL A DEFICIENCY. *The Journal of General Physiology*.
- Hecht, S., & Schlaer, S. (1938). An Adaptometer for Measuring Human Dark Adaptation*. *Journal of the Optical Society of America*, *28*(7), 269. <https://doi.org/10.1364/josa.28.000269>
- Hood, D. C., & Hock, P. A. (1973). Recovery of cone receptor activity in the frog's isolated retina. *Vision Research*, *13*(10), 1943–1951. [https://doi.org/10.1016/0042-6989\(73\)90065-5](https://doi.org/10.1016/0042-6989(73)90065-5)
- Jackson, G. R., Scott, I. U., Kim, I. K., Quillen, D. A., Iannaccone, A., & Edwards, J. G. (2014). Diagnostic sensitivity and specificity of dark adaptometry for detection of age-related macular degeneration. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *55*(3), 1427–1431. <https://doi.org/10.1167/iovs.13-13745>
- Jamel, C., Jean-Claude, K., Pascal, M., Sophie, G., & Axel, K. (1988). Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissues. *Nature*, *333*(30).
- Jensen, H., Warburg, M., Sjo, O., & Schwartz, M. (1995). Duchenne muscular dystrophy: Negative electroretinograms and normal dark adaptation. Reappraisal of assignment of X

- linked incomplete congenital stationary night blindness. *Journal of Medical Genetics*, 32(5), 348–351. <https://doi.org/10.1136/jmg.32.5.348>
- Joselevitch, C. (2008). Human retinal circuitry and physiology. *Psychology & Neuroscience*, 1(2), 141–165. <https://doi.org/10.3922/j.psns.2008.2.008>
- Kalloniatis, M., & Luu, C. (2007). Light and Dark Adaptation. *Webvision*. <https://webvision.med.utah.edu/book/part-viii-psychophysics-of-vision/light-and-dark-adaptation/>
- Kiyomoto, B. H., Oliveira, A. S. B., & Gabbai, A. A. (1999). Doenças Neuromusculares. *Revista Neurociências*, 4(2), 47–56. <https://doi.org/10.34024/rnc.1996.v4.9007>
- 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(3), 509–517. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90504-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90504-6)
- Koenig, Michel, Beggs, A. H., Moyer, M., Scherpf, S., Heindrich, K., Bettecken, T., Meng, G., Müller, C. R., Lindlöf, M., Kaariainen, H., de la Chapelle, A., Kiuru, A., Savontaus, M. L., Gilgenkrantz, H., Récan, D., Chelly, J., Kaplan, J. C., Covone, A. E., Archidiacono, N., ... Kunkel, L. M. (1989). *The molecular basis for duchenne versus becker muscular dystrophy: Correlation of severity with type of deletion*. 45(4), 498–506. <https://doi.org/10.1016/1>
- Kohlrausch, A. (1922). Untersuchungen mit farbigen Schwenprtiflichtern tiber den Dunkeladaptationsverlauf des normalen Auges. *Archives of Ophthalmology*, 169, 113.
- Kohlrausch, A. (1931). Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie. *J. Springer*, 12(2), 1499.
- Kolb, H. (2003). How the Retina Works. *American Scientist*, 91(1), 28. <https://doi.org/10.1511/2003.11.841>
- Lamb, T. D., & Pugh, E. N. (2004). Dark adaptation and the retinoid cycle of vision. *Progress in Retinal and Eye Research*, 23(3), 307–380. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2004.03.001>
- Leibrock, C. S., Reuter, T., & Lamb, T. D. (1998). Molecular Basis of Dark Adaptation in Rod Photoreceptors. In *Eye* (12 (Pt 3B), pp. 511–520).
- Lidov, H. G. W., Byers, T. J., Watkins, S. C., & Kunkel, L. M. (1990). Localization of dystrophin to postsynaptic regions of central nervous system cortical neurons. In *Nature* (Vol. 348, Issue 6303, pp. 725–728). <https://doi.org/10.1038/348725a0>
- Lidov, H. G. W., & Kunkel, L. M. (1997). Dp140: Alternatively spliced isoforms in brain and kidney. *Genomics*, 45(1), 132–139. <https://doi.org/10.1006/geno.1997.4905>
- Lindlöf, M., Kiuru, A., Kaariainen, H., Kalimo, H., Lang, H., Pihko, H., Rapola, J., Somer, H., Somer, M., Savontaus, M. L., & De la Chapelle, A. (1989). Gene deletions in X-linked muscular dystrophy. *American Journal of Human Genetics*, 44(4), 496–503.

- Manzur, A. Y., Kinali, M., & Muntoni, F. (2008). Update on the management of Duchenne muscular dystrophy. *Archives of Disease in Childhood*, *93*(11), 986–990. <https://doi.org/10.1136/adc.2007.118141>
- Mata, N. L., Radu, R. A., Clemmons, R. S., & Travis, G. H. (2002). Isomerization and oxidation of vitamin A in cone-dominant retinas: A novel pathway for visual-pigment regeneration in daylight. *Neuron*, *36*(1), 69–80. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00912-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00912-1)
- Mehler, M. F., & Victor, J. D. (2000). Comparison of thresholds for high-speed drifting vernier and a matched temporal phase-discrimination task. *Vision Research*, *40*, 1839–1855.
- Mehler, Mark F. (2000). Brain dystrophin, neurogenetics and mental retardation. *Brain Research Reviews*, *32*(1), 277–307. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(99\)00090-9](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(99)00090-9)
- Miyake, Y., Yagasaki, K., Horiguchi, M., Kawase, Y., & Kanda, T. (1986). Congenital Stationary Night Blindness With Negative Electroretinogram: A New Classification. *Archives of Ophthalmology*, *104*(7), 1013–1020. <https://doi.org/10.1001/archophth.1986.01050190071042>
- Morigiwa, K., & Vardi, N. (1999). Differential expression of ionotropic glutamate receptor subunits in the outer retina. *Journal of Comparative Neurology*, *405*(2), 173–184. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19990308\)405:2<173::AID-CNE3>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19990308)405:2<173::AID-CNE3>3.0.CO;2-L)
- Morris, G. E., Simmons, C., & Man, N. T. (1995). Apo-Dystrophins (DP140 and DP71) and Dystrophin-Splicing Isoforms in Developing Brain. In *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Vol. 215, Issue 1, pp. 361–367). <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.2474>
- Muller, H. K. (1931). Uber den Einfluss verschieden langer Vorbelichtung auf die Dunkeladaptation und auf die Fehlergrösse der Schwellenreizbestimmung während der Dunkelanpassung. *Archives of Ophthalmology*, *125*.
- Muntoni, F., Torelli, S., & Ferlini, A. (2003). Dystrophin and mutations: One gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurology*, *2*(12), 731–740. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(03\)00585-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(03)00585-4)
- Nagy, B. V., Mirella, T. S., & Ventura, D. F. (2017). *Dark Adaptation in Duchenne Muscular Dystrophy with a Short Protocol To investigate if Duchenne Muscular Dystrophy*.
- Pascual Pascual, S. I., Molano, J., & Pascual-Castroviejo, I. (1998). Electroretinogram in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Pediatric Neurology*, *18*(4), 315–320. [https://doi.org/10.1016/S0887-8994\(97\)00208-7](https://doi.org/10.1016/S0887-8994(97)00208-7)
- Pillers, D.-A. M., Bulman, D. E., Weleber, R. G., Sigesmund, D. A., A., M. M., Powell, B. R., Murphey, W. H., Westall, C., Panton, C., Becker, L. E., & Worton, R. G. (1993). Dystrophin expression in the human retina is required for normal function as defined by electroretinography. *Nature Genetics*, *4*, 300–304. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/ng0793-300>
- Pillers, D.-A. M., Weleber, R. G., Green, D. G., Rash, S. M., Dally, G. Y., Howard, P. L.,

- Power, M. R., Hood, D. C., Chapman, V. N., Ray, P. N., & Woodward, V. R. (1999). Effects of dystrophin isoforms on signal transduction through neural retina: Genotype-phenotype analysis of Duchenne muscular dystrophy mouse mutants. *Molecular Genetics and Metabolism*, *66*, 100–110.
- Rapaport, D., Greenberg, D. S., Tal, M., Yaffe, D., & Nude, U. (1993). *Dp71*, the nonmuscle product of the Duchenne muscular dystrophy gene is associated with the cell membrane. *328*(1), 197–202. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80992-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80992-4)
- Reuter, T. (2011). Fifty years of dark adaptation 1961–2011. *Vision Research*, *51*(21–22), 2243–2262. <https://doi.org/10.1016/j.visres.2011.08.021>
- Ricotti, V., Jäggle, H., Theodorou, M., Moore, A. T., Muntoni, F., & Thompson, D. A. (2016). Ocular and neurodevelopmental features of Duchenne muscular dystrophy: A signature of dystrophin function in the central nervous system. *European Journal of Human Genetics*, *24*(4), 562–568. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2015.135>
- Rodieck, R. W. (1998). *The First Steps in Seeing*.
- Rodius, F., Claudepierre, T., Rosas-Vargas, H., Cisneros, B., Montanez, C., Dreyfus, H., Mornet, D., & Rendon, A. (1997). Dystrophins in developing retina: Dp260 expression correlates with synaptic maturation. *NeuroReport*, *8*(9–10), 2383–2387. <https://doi.org/10.1097/00001756-199707070-00056>
- Saari, J. C., Bredberg, D. L., & Noy, N. (1994). Control of substrate flow at a branch in the visual cycle. *33*(10), 3106–3112. <https://doi.org/10.1021/bi00176a045>
- Saldanha, R. M., Gasparini, J. R., Silva, L. S., Carli, R. R., Castilho, V. U. D. de, Neves, M. M. P. das, Araújo, Fernando Paiva]Sales, P. C. de A., & Neves, J. francisco N. P. das. (2005). Anestesia em Paciente Portador de Distrofia Muscular de Duchenne. Relato de Casos. *Rev Bras Anesthesiol*, *55*(4), 445–449. http://www.scielo.br/pdf/rba/v55n4/en_v55n4a09.pdf
- Sato, S., & Kefalov, V. J. (2016). cis Retinol oxidation regulates photoreceptor access to the retina visual cycle and cone pigment regeneration. *Journal of Physiology*, *594*(22), 6753–6765. <https://doi.org/10.1113/JP272831>
- Schmitz, F., & Drenckhahn, D. (1997). Localization of dystrophin and β -dystroglycan in bovine retinal photoreceptor processes extending into the postsynaptic dendritic complex. *Histochemistry and Cell Biology*, *108*(3), 249–255. <https://doi.org/10.1007/s004180050165>
- Schwartz, S. H. (2010). *Visual Perception* (S. H. Schwartz (ed.); 4Th ed.). 2010.
- Tremblay, F., De Becker, I., Riddell, D. C., & Dooley, J. M. (1994). Duchenne muscular dystrophy: Negative scotopic bright-flash electroretinogram and normal dark adaptation. *Canadian Journal of Ophthalmology*, *29*(6), 280–283.
- Tremblay, François, De Becker, I., Dooley, J. M., & Riddell, D. C. (1994). Duchenne muscular dystrophy: Negative scotopic bright-flash electroretinogram but not congenital stationary night blindness. *Canadian Journal of Ophthalmology*, *29*(6), 274–279.

- Ueda, H., Baba, T., Terada, N., Kato, Y., Tsukahara, S., & Ohno, S. (1997). Dystrophin in rod spherules; submembranous dense regions facing bipolar cell processes. *Histochemistry and Cell Biology*, *108*, 243–248.
- Ueda, H., Kato, Y., Baba, T., Terada, N., Fuji, Y., Tsukahara, S., & Ohno, S. (1997). Immunocytochemical study of dystrophin localization in cone cells of mouse retinas. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *38*(8), 1627–1630.
- Ueda, H., Tsukahara, S., Kobayashi, T., & Ohno, S. (1995). Immunocytochemical study of dystrophin-related protein in the rat retina. *Ophthalmic Research*, *27*(4), 219–226. <https://doi.org/10.1159/000267709>
- Vardi, N., Morigiwa, K., Wang, T. L., Shi, Y. J., & Sterling, P. (1998). Neurochemistry of the mammalian cone “synaptic complex.” *Vision Research*, *38*(10), 1359–1369. [https://doi.org/10.1016/S0042-6989\(98\)00007-8](https://doi.org/10.1016/S0042-6989(98)00007-8)
- Wald, G., & Clark, A. B. (1936). Sensory adaptation and chemistry of the retinal rods. *Jornal Gen Physiol Physiol*, 116–152.
- Wang, J. S., & Kefalov, V. J. (2009). An Alternative Pathway Mediates the Mouse and Human Cone Visual Cycle. *Current Biology*, *19*(19), 1665–1669. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.07.054>
- Wässle, H. (2004). Parallel processing in the mammalian retina. *Nature Reviews Neuroscience*, *5*(10), 747–757. <https://doi.org/10.1038/nrn1497>
- Werneck, L. C., & Bonilla, E. (1990). Distrofina Na Diferenciação Das Distrofias De Duchenne E Becker. *Arq NEURO-Psiquiat*, *48*(4), 454–464. <https://doi.org/ISSN 0004-282X>
- Wersinger, E., Bordais, A., Schwab, Y., Sene, A., Bénard, R., Alunni, V., Sahel, J. A., Rendon, A., & Roux, M. J. (2011). Reevaluation of dystrophin localization in the mouse retina. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *52*(11), 7901–7908. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-7519>
- Winsor, C. P., & Clark, A.-B. (1936). Dark Adaptation after Varying Degrees of Light Adaptation. *National Academy Of Sciences*, *22*(6), 400–404.
- Wu, J., Seregard, S., & Algere, P. V. (2006). Photochemical Damage of the Retina. *Survey of Ophthalmology*, *51*(5), 461–481. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2006.06.009>
- Yiu, E. M., & Kornberg, A. J. (n.d.). Duchenne muscular dystrophy. *Neurol India.*, *56*(3), 236–247. <https://doi.org/10.4103/0028-3886.43441>
- 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*(6), 442–447. <https://doi.org/10.1136/jmg.18.6.442>
- Zatz, Mayana. (2002). A biologia molecular contribuindo para a compreensão e a prevenção das doenças hereditárias. *Ciência & Saúde Coletiva*, *7*(1), 85–99. <https://doi.org/10.1590/s1413-81232002000100008>

Zeitig, C., Robson, A. G., & Audo, I. (2015). Congenital stationary night blindness: An analysis and update of genotype-phenotype correlations and pathogenic mechanisms. *Progress in Retinal and Eye Research*, 45, 58–110.
<https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2014.09.001>

APÊNDICES

APÊNDICE I

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 Eletrorretinograma (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 _____.

APÊNDICE II

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 - Eletrorretinograma (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: _____

APÊNDICE III

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 Eletrorretinograma (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

APÊNDICE IV

ARTIGO SUBMETIDO E ACEITO PARA REVISÃO

Investigative Ophthalmology & Visual Science

Correlations between dark-adapted rod threshold elevations and ERG response deficits in Duchenne muscular dystrophy

Mirella Telles Salgueiro Barboni^{1,2*}, Sarah Leonardo Dias^{2*}, Leonardo Aparecido Silva², Francisco Max Damico^{2,3}, Kallene Summer Vidal², Marcelo Fernandes Costa², Balázs Vince Nagy⁴, Jan Kremers⁵, Dora Fix Ventura²

¹Department of Ophthalmology, Semmelweis University, Budapest, Hungary

²Department of Experimental Psychology, Institute of Psychology, University of Sao Paulo, Brazil

³Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, University of Sao Paulo, Brazil

⁴Department of Mechatronics, Optics and Mechanical Engineering Informatics, Budapest University of Technology and Economics, Budapest, Hungary

⁵Department of Ophthalmology, University Hospital Erlangen, Erlangen, Germany

*M.T.S.B. and S.L.D. contributed equally to the paper

Funding information: The study was supported by Sao Paulo Research Foundation (FAPESP grant numbers 2016/04538-3 and 2014/26818-2 to DFV; 2015/22227-2 to KSV), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq grant number 404239/2016-1 to MTSB), and Tempus Public Foundation (grant number 465858 to MTSB).

Running head: Abnormal rod function in DMD patients

Word count: 4847 words. Table: 1, Figures: 7. Supplementary material included.

The authors declare no competing interests.

Corresponding authors

Mirella Telles Salgueiro Barboni

Department of Ophthalmology

Semmelweis University

1085 Budapest, Mária u. 39.

Hungary

Phone: +36 70 413-4954

mtsbarboni@gmail.com ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0717-1852>

Dora Fix Ventura

Department of Experimental Psychology

University of Sao Paulo

Prof. Mello de Moraes, 1721, 05508-030 Sao Paulo

Brazil

Phone: +55 11 3091-1916

dventura@usp.br ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7616-4031>

Other authors' email and ORCID

SLD: sarah.leonardo@gmail.com <https://orcid.org/0000-0001-6138-9353>

LAD: leo.ap.silva@usp.br <https://orcid.org/0000-0003-1399-3913>

FMD: fmdamico@yahoo.com <https://orcid.org/0000-0002-2594-0336>

KSV: kallenesummer@gmail.com <https://orcid.org/0000-0003-4559-2612>

MFC: costamf@usp.br <https://orcid.org/0000-0002-3944-8457>

BVN: nagybal@gmail.com <https://orcid.org/0000-0002-8489-7200>

JK: jan.kremers@uk-erlangen.de <https://orcid.org/0000-0002-9293-7380>

ABSTRACT

Purpose: To characterize changes in the full-field flash electroretinogram (ERG) in association with psychophysical dark-adapted visual thresholds in genetically characterized DMD patients either lacking Dp427 (DMD Up 30) or at least Dp260 in addition to Dp427 (DMD Down 30).

Methods: 21 DMD patients and 27 age-similar controls participated in this study. Dark-adapted (0.01, 3.0, and 10 cd.s/m² flashes) and light-adapted (3.0 cd.s/m² flash) ERGs were recorded in the dominant eye following ISCEV standard protocols. Visual detection thresholds to red (625 nm; cone function) and green (527 nm; rod function) LED flashes (2° diameter) were measured during a dark adaptation period after a one minute exposure to a bleaching light (3000 cd/m²). Initially, 8-minutes of interleaved red and green thresholds were measured. After additional 5-minutes of dark-adaptation, a second set of threshold measurements to green stimuli was performed during the subsequent 6-minutes.

Results: Dark-adapted b-waves were reduced ($p < 0.001$) and the a-wave to strong flash was delayed ($p = 0.019$) in DMD Down 30 patients (lacking Dp427 and at least Dp260). Dark-adapted cone thresholds did not differ between the groups. In contrast, dark-adapted rod thresholds were elevated ($p = 0.001$) in DMD Down 30 patients (mean = -3.2 ± 1.1 log cd/m²) relative to controls (mean = -4.2 ± 0.3 log cd/m²). Dark-adapted b-wave amplitudes were negatively correlated with dark-adapted rod thresholds in DMD patients (Spearman $r = -0.943$, $p = 0.005$). The changes were much smaller or absent in patients with intact Dp260.

Conclusion: Dp260 is particularly required for normal retinal physiology in dark adaptation.

Keywords: retina, rod, cone, electroretinogram, dark-adaptation, human vision, DMD, dystrophin protein

INTRODUCTION

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a monogenic X-linked genetic condition caused by mutations of the *DMD* gene (MIM: 300377) affecting dystrophin protein (Dp) expression^{1,2}. In addition to the characteristic progressive muscular dysfunction³, patients with DMD show non-progressive cognitive disturbances⁴ and altered retinal physiology^{5,6} because dystrophins play an important role in synaptic structures^{7–13} and in glial cell membranes^{14,15} in the mammalian central nervous system (CNS) including the retina.

Reduced or nearly abolished scotopic full-field flash electroretinogram (ERG) b-wave, the positive ERG component, is a classical feature of DMD that has been confirmed by several groups in the past decades in patients^{5,6,16–26} and in mouse models of DMD^{8,27–30}.

The negative dark-adapted ERG in which the b-wave is smaller than the electro-negative a-wave (see Figure 2B), found in DMD patients and mouse models of DMD, has been mainly associated with the alteration of Dp427^{24,27}, a dystrophin protein encoded by a promoter located at the beginning (exon 1) of the *DMD* gene, and Dp260^{8,23,24,29}, expressed by an independent internal promoter located at exon 30 of the *DMD* gene³¹. Both Dp427 and Dp260 are primarily expressed in the outer plexiform layer of the mammalian retina^{6–8} and possibly in the inner nuclear layer¹³.

A shorter *DMD* gene product, the Dp140 (promoter at exon 45), that is strongly expressed in the developing brain of the mouse and associated with cognitive dysfunctions in DMD patients^{32,33}, is also expressed in the retina¹³. However, its specific role in retinal physiology has not been elucidated. In addition, the shortest *DMD* gene product, Dp71, is

strongly expressed in Muller cells of the mammalian retina ⁷. Its promoter is located far downstream in the gene (at exon 63). Since distal mutations are rare in humans, the specific roles of this dystrophin protein in the human visual system has not been investigated in detail. There is evidence that genetic alterations presumably preventing expression of Dp71 result in a severe ERG phenotype ²⁴ and its selective absence resulted in altered ERGs in Dp71-null mice ³⁴.

Despite structural ^{12,13,35} and functional ^{18,30,36} evidence that abnormal synaptic transmission between photoreceptors and bipolar cells is associated with *DMD* gene mutations, obvious clinically relevant visual dysfunctions, such as altered visual acuity, are not found in DMD patients. However, red-green color deficiency ³⁷ and reduced spatial luminance contrast sensitivity ^{36,38} have been reported by our group.

About 25 years ago, two studies showed normal dynamic dark-adaptation processes in DMD patients ^{21,39}. In the first study ³⁹, normal thresholds to, presumably, white flashes were measured during 40 minutes of dark-adaptation after five minutes of bleach (600 cd/m²) in three patients with a clinical diagnosis of DMD (two of them with abnormal ERG) but without genetic confirmation. The second study ²¹ showed normal averaged thresholds during dark adaptation in DMD and Becker Muscular Dystrophy (BMD, a mild variant of the disease) patients among other preserved visual functions. Unfortunately, details on their dark-adaptation procedure were not reported. It is unclear if the measured thresholds in these studies were mediated by cone or by rod activity. The severe dysfunction of rod-driven ERGs suggests that psychophysical dark-adaptation thresholds may be changed when mainly mediated by rod activity. Furthermore, the individual thresholds may then be correlated with ERG parameters. Finally, the functional deficits may depend on which dystrophins are affected and thus on the location of the gene mutation.

In the present study, we measured full-field ERGs and psychophysical dark-adapted visual thresholds (separately for cone and rod pathways) in genetically characterized DMD patients with genetic alterations either upstream of exon 30, thereby exclusively affecting the expression of Dp427 (DMD Up 30), or downstream of exon 30 (DMD Down 30), affecting the expression of Dp427 and Dp260 and possibly of Dp140 and Dp116. The results have been partially published as an ARVO abstract (IOVS 61: 5047 e-abstract).

METHODS

Subjects

The experiments were performed in accordance with the tenets of the declaration of Helsinki and were approved by the Human Research Ethics Committee of the Institute of Psychology at the University of São Paulo (CAEE n°85512617.6.0000.5561), Brazil. All subjects, or their legal guardians, gave written informed consent prior to the examinations.

A group of 21 DMD patients (mean age = 13.8 ± 4.3 years; all males) and 27 age matched ($F_{(2,47)} = 0.999$, $p = 0.376$) healthy volunteers (mean age = 16.1 ± 5.5 years; 13 males) participated in this study. We have pooled the data from male and female control subjects because similar ERG responses and dark-adapted visual thresholds were obtained in the two groups (see supplemental material).

The subjects underwent a full ophthalmological examination including measurements of refraction, of best-corrected visual acuity and of intraocular pressure, slit-lamp biomicroscopy, and funduscopy examination. Inclusion criteria were: normal best-corrected distant visual acuity of 20/20 or better; absence of ocular hypertension and of ocular diseases, such as cataract, in the tested eye; absence of diseases that could affect the central nervous

system (other than DMD for the experimental group); no medications targeting the central nervous system.

Table 1 shows demographic information of two DMD groups that were determined according to the location of the genetic alteration in the *DMD* gene. Determination of affected dystrophin proteins was based on the genomic organization of the human *DMD* gene (Figure 1, based on Muntoni et al., 2003). Seven DMD patients (DMD Up 30; mean age = 13.9 ± 6.3 years) displayed genetic alterations upstream of exon 30 with, presumably, only Dp427 affected. The other 14 DMD patients (DMD Down 30; mean age = 13.7 ± 3.1 years) displayed genetic alterations downstream of exon 30 indicating that additional dystrophin proteins were affected (as indicated in Table 1 and Figure 1). Patients who underwent both ERG and dark-adapted examinations ($N = 10$), are indicated by a symbol that correspond to the symbols used in correlation plots (see Figure 7). The other patients either participated in the ERG recordings or in the psychophysical measurements.

the localization of genetic alterations (downstream exon 30) of 14 DMD Down 30 patients. Observe that the mutations in the DMD Down 30 of our patients were always located upstream of exon 63, meaning that all patients had presumably a normal expression of the shortest *DMD* gene product (Dp71).

ERG recordings

Dark-adapted and light-adapted flash ERGs according to ISCEV (International Society of Clinical Electrophysiology of Vision) standards (McCulloch et al., 2015) were recorded monocularly from the dilated dominant eye of 28 subjects (15 DMD patients and 13 controls). First, the subjects were dark-adapted for 20 minutes. Flash stimuli of 0.01 cd.s/m², 3.0 cd.s/m², and 10 cd.s/m² were presented in sequence with inter-stimulus time of 2, 10, and 20 seconds, respectively. Subsequently, the subjects underwent light-adaptation to a background of 30 cd/m² for 10 minutes. Then ERG responses to 3.0 cd.s/m² flashes (standard flash) were recorded with inter-stimulus time of 0.5 seconds. ERG responses were recorded with DTL fiber electrodes placed under the lower lid and attached to the outer and the inner canthus. The reference and the ground (gold cup) skin electrodes were attached to the ipsilateral temple and forehead, respectively. Signals were amplified 100,000x, filtered between 1 and 300 Hz, and sampled at 512 Hz using the RetiPort system (Roland Consult, Brandenburg, Germany). ERG responses were averages of five 256-millisecond episodes for the 10 cd.s/m² flashes and of 10 such episodes for the weaker flashes.

Figure 2 shows ERG responses recorded from a control subject to dark-adapted (DA; scotopic) flash with 0.01 cd.s/m² (Figure 2A), 3.0 cd.s/m² (Figure 2B), and 10 cd.s/m² (Figure 2C) strengths. A light-adapted (LA; photopic) ERG to a 3.0 cd.s/m² flash is shown in Figure 2D. As shown in each trace, the peak amplitude of the a-wave (initial negativity) was defined as the difference in μV between the baseline (average of 5 ms of ERG episode before the flash

onset) and the minimum between 10 and 30 ms post-stimulus. The b-wave (positive peak between 30 and 60 ms post-stimulus) amplitude was the difference between the a-wave peak amplitude and the b-wave maximum amplitude. Photopic negative response (PhNR) was measured from b-wave. Implicit time (ms) was the interval between the flash onset and the peak amplitude. For the DA standard flash (3.0 cd.s/m^2), the b:a amplitude ratio was calculated.

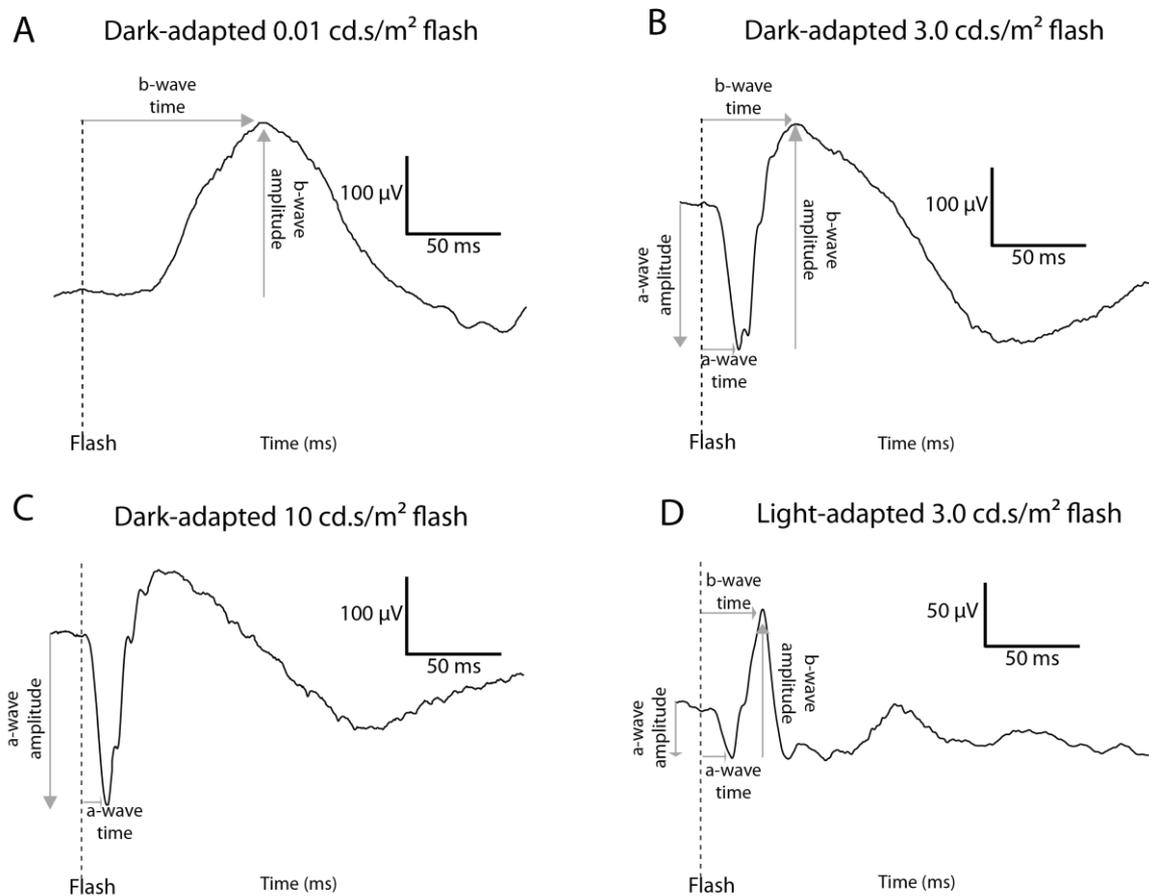


Figure 2. Standard ISCEV ERG responses and parameters analyzed. Flash onset at $t = 0$ ms is shown by the dashed line; analysed parameters are given by grey arrows. The dark-adapted (DA) 0.01 cd.s/m^2 flash ERG was recorded after 20 minutes of dark-adaptation and eliciting only a positive (b-wave) peak (A). DA 3.0 cd.s/m^2 (standard) flash ERG (B) and 10 cd.s/m^2 flash ERG (C) both showed a negative (a-wave) and positive (b-wave) components.

Light-adapted 3.0 cd.s/m² ERG shows negative (a-wave) and positive (b-wave) components (D).

Detection thresholds during dark adaptation

Flash detection thresholds during dark adaptation after a bleach were monocularly measured in non-dilated dominant eyes of 38 subjects (16 DMD patients and 22 controls) using the Roland dark adaptometer (Roland Consult, Brandenburg, Germany) equipped with a Q450 Ganzfeld stimulator. A fixation camera for pupil detection monitored fixation during the session. The subjects were instructed to press a key when they saw a flash. Thresholds to red (625 nm peak wavelength for cone mediated detection) and green (527 nm peak wavelength for rod mediated detection) LED flashes (2° diameter) presented at 20° distance from a fixation target were measured during dark-adaptation after one minute of bleach to 3000 cd/m² white light. We have adapted the bleach period (originally 5 minutes) and bleach luminance (originally 7000 cd/m²) so that it was tolerated by the young subjects. In a pilot study, four different luminances (700, 3000, 5000, and 7000 cd/m²) of the bleach light were used, keeping one-minute bleach time, to exam control subjects (N = 5). We found that dark-adapted cone ($p = 0.779$) and rod ($p = 0.960$) thresholds as well as rod recovery time to $-3 \log \text{cd/m}^2$ ($p = 0.542$) were similar with 3000 cd/m² and 7000 cd/m² bleach in control subjects (supplemental material).

After one minute of bleach, the tests started with eight minutes of interleaved red and green stimuli presentations to measure cone and rod mediated thresholds in parallel (Figure 3B, red-triangles and green-circles respectively). Within this period, a full recovery of cone mediated thresholds was obtained. After additional five minutes of dark adaptation, a second set of measurements was performed with only green stimuli for six minutes to measure additional rod mediated thresholds. The thresholds generally reach a plateau within this period.

The procedure started with the determination of a threshold to red flashes. After 30 seconds, the procedure was repeated for green flashes. The alternation in threshold measurements in 30 sec periods was continued throughout the first part of the test. Flashes were presented once every 2 seconds (flash duration = 250 ms). After every flash, the subject was requested to indicate if the flash was detected by pressing a button within 750 ms. Absence of a response was interpreted that the flash was not detected. If a flash was detected, the flash strength was decreased by 6 dB. If the flash was not detected the flash strength increased by 2 dB.

Dark-adapted cone threshold was calculated by averaging the intensities (in log cd/m², only when the flash was seen) required to detect (the change from not detected to detected luminance) the red flash during the last minute of the first period (cone threshold). Dark-adapted rod threshold was obtained by averaging detection intensities (log cd/m²) during the last three minutes of the second protocol (rod threshold).

Statistical analysis

ERG amplitudes and phases and visual thresholds are presented as means \pm one standard deviation. Group comparisons were performed using one-way ANOVAs. Paired comparisons were performed using Bonferroni post-hoc analyses. Significant correlations among variables were evaluated with Spearman coefficient (SPSS, Statistical Package for the Social Sciences, Hong Kong, China). p values < 0.05 were considered significant.

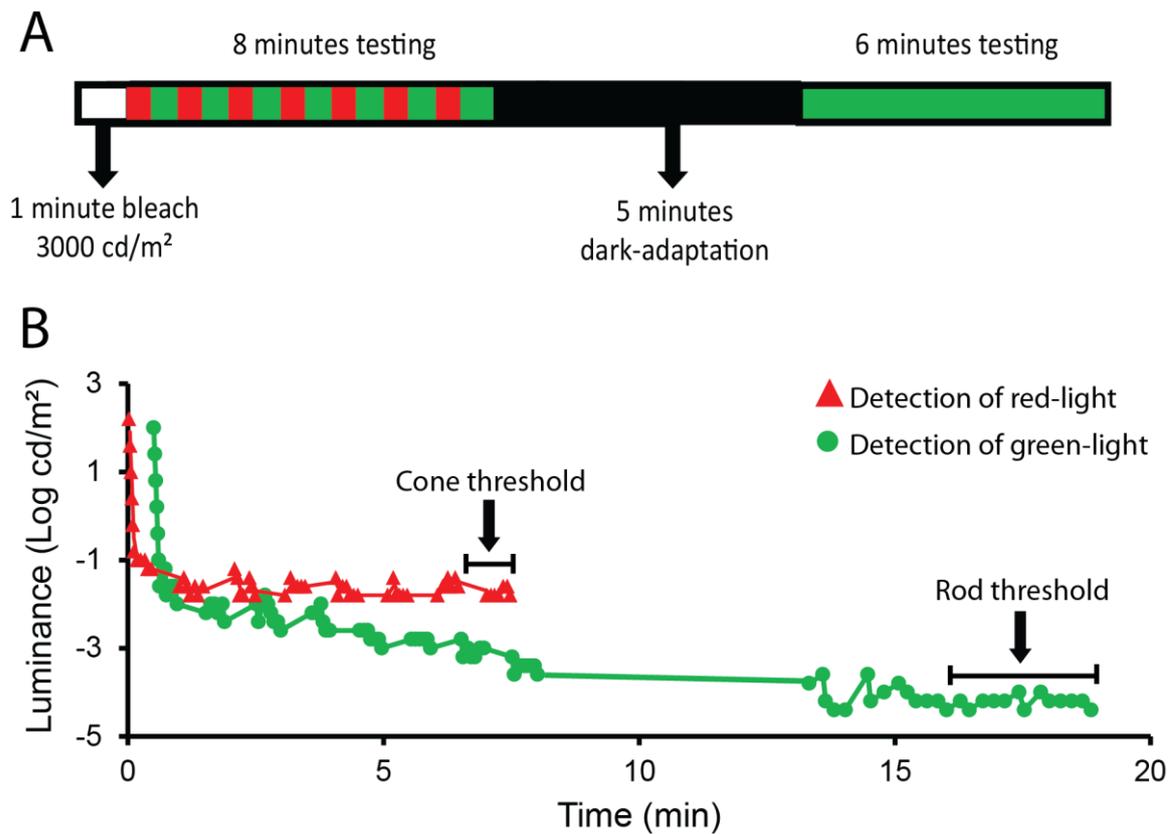


Figure 3. Dark-adapted visual thresholds. Thresholds were determined in darkness after 1 minute of bleach to 3000 cd/m² full-field. The dark-adaptation curve was measured by the presentation of 250 ms flashes of red- and green-lights alternating every 30 seconds. After 8 minutes of measurements and 5 minutes interval in darkness, thresholds were measured by the presentation of 250 ms flashes of only green flashes (A). Representative thresholds measured with a control subject (B). Red-triangles show the red-light detection thresholds while green-circles thresholds to the green flashes. Dark-adapted cone threshold was the averaged threshold luminances during the last minute of the first protocol. Dark-adapted rod threshold was the averaged luminances for measurements during the last three minutes of the second protocol.

RESULTS

Electrophysiologically measured retinal responses to light

Dark-adapted ERG responses to the weak (0.01 cd.s/m²) flash (Figure 4A) elicited a positive (b-wave) component with the peak at about 90 ms after flash onset. Mean (\pm one standard deviation) amplitudes differed significantly between the groups ($F_{(2,26)} = 10.519$, $p = 0.001$). B-wave amplitudes of control subjects (mean = $235.8 \pm 100.4 \mu\text{V}$) were significantly higher ($p < 0.001$) than those of DMD Down 30 patients (mean = $52.2 \pm 36.9 \mu\text{V}$). Intermediate amplitudes were found in the DMD Up 30 group (mean = $195.8 \pm 168.2 \mu\text{V}$). Their mean amplitude did not significantly differ from those of control subjects ($p = 0.998$) and of DMD Down 30 patients ($p = 0.053$). There was no significant group effect on b-wave implicit time ($F_{(2,26)} = 2.131$, $p = 0.141$).

Figure 4B shows averaged responses of control subjects and patients to the dark-adapted 3.0 cd.s/m² flash showing an a- and a b-wave peaking at about 18 and 40 ms, respectively. In control subjects, the mean b-wave amplitude was $351.3 \pm 116.4 \mu\text{V}$ whereas the mean a-wave was $214.7 \pm 69.6 \mu\text{V}$. Individual b:a ratios varied between 1.3 and 2 for the control subjects. Amplitudes ($F_{(2,26)} = 2.485$, $p = 0.105$) and times ($F_{(2,26)} = 0.821$, $p = 0.452$) of the a-wave were comparable among the groups, while b-waves were remarkably different between the groups ($F_{(2,26)} = 14.947$, $p < 0.001$). B-wave amplitudes of Down 30 patients (mean = $144.7 \pm 57.5 \mu\text{V}$) were significantly decreased ($p < 0.001$). Similar to the results with the weak flash, DMD Up 30 patients showed intermediate b-wave amplitudes (mean = $223.5 \pm 41.6 \mu\text{V}$), not differing statistically from those of control subjects ($p = 0.064$) or of DMD Down 30 patients ($p = 0.466$). The mean b-wave implicit times were similar among the three groups ($F_{(2,26)} = 3.004$, $p = 0.069$). The b:a ratio data had an approximately normal distribution and according tests were applied. The mean b:a ratios (Figure 4B bar plot) were significantly different between groups ($F_{(2,26)} = 36.183$, $p < 0.001$). The b:a ratio was < 1 for nine out of 10 DMD Down 30 patients (mean =

0.6 ± 0.3) and ≥ 1 for all DMD Up 30 patients (mean = 1.3 ± 0.5) and all control subjects (mean = 1.7 ± 0.2). Mean b:a ratios were significantly lower for DMD Down 30 patients compared to both controls ($p < 0.001$) and DMD Up 30 patients ($p = 0.001$).

Dark-adapted a- and b-waves elicited by a strong (10 cd.s/m^2) flash were recorded and the respective amplitudes and implicit times were compared between the groups. Figure 4C shows that there was a significant group effect ($F_{(2,26)} = 5.610$, $p = 0.010$) in the time to peak of the a-wave while amplitudes did not differ significantly between the groups ($F_{(2,26)} = 0.900$, $p = 0.420$). The mean a-wave implicit time measured in the control group was $14.7 \pm 0.6 \text{ ms}$, similar ($p = 0.711$) to what has been observed for DMD Up 30 patients (mean = $14.2 \pm 0.4 \text{ ms}$). In contrast, the DMD Down 30 patients showed significantly longer a-wave peak times (mean = $15.6 \pm 1.0 \text{ ms}$; $p = 0.019$) and with a marginal difference ($p = 0.050$) compared to DMD Up 30 patients. The dark-adapted b-wave elicited by the 10 cd.s/m^2 condition confirmed the results obtained with the standard 3.0 cd.s/m^2 flash: there was a group effect on b-wave amplitudes ($F_{(2,26)} = 6.766$, $p = 0.005$) with DMD Down 30 patients showing significantly lower b-waves compared to controls ($p = 0.004$), but not compared to DMD Up30 patients ($p = 0.863$). The last group showed intermediate b-wave amplitudes. The mean b-wave implicit time showed group effect ($F_{(2,26)} = 0.166$, $p = 0.848$), however, paired comparisons using Bonferroni post-hoc analyses revealed that all three groups had statistically similar peak times ($p > 0.058$).

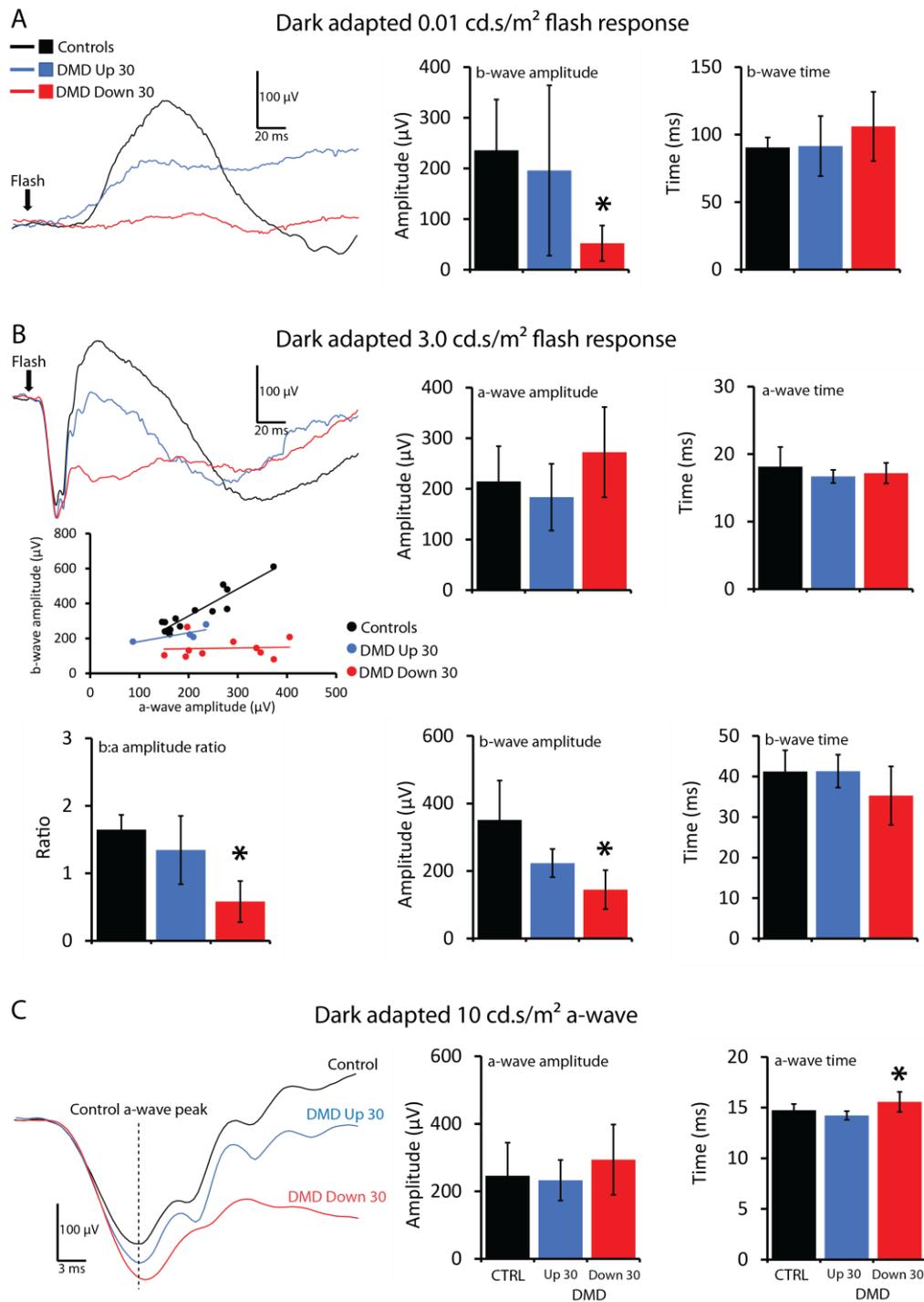


Figure 4. Dark-adapted ERG results. Averaged traces and mean (\pm one s.d.) amplitudes, implicit times, and b:a ratios for controls (black symbols), DMD Up 30 (blue symbols), and DMD Down 30 (red symbols) patients for dark-adapted ERG measurements with three flash strengths: 0.01 cd.s/m² (b-wave only; A), 3.0 cd.s/m² (B) 10 cd.s/m² (a-wave only; C). *significant difference ($p < 0.05$) compared to the control group.

Averaged light-adapted ERG responses are shown in Figure 5A with a more detailed representation of the b-wave in Figure 5B. The averaged waveforms were similar for the three groups. A significant group effect was observed for the a-wave amplitude ($F_{(2,26)} = 4.496$, $p = 0.021$). DMD Down 30 patients showed slightly larger a-wave amplitudes (Figure 5C) with marginal statistical differences compared to control subjects ($p = 0.052$) and DMD Up 30 patients ($p = 0.067$). In contrast, a-wave peak times were comparable ($F_{(2,26)} = 0.191$, $p = 0.827$) among the three groups (Figure 5D). Light-adapted b-wave amplitudes (Figure 5C) were also comparable in the three groups ($F_{(2,26)} = 0.004$, $p = 0.996$), while light-adapted b-wave times (Figure 5D) were significantly delayed for DMD Up 30 patients compared to control subjects ($p = 0.017$). DMD Down 30 patients showed a non-significant ($p = 0.059$) delay of the b-wave compared to control subjects. In addition, mean photopic negative response (PhNR) amplitudes (group effect: $F_{(2,26)} = 0.093$, $p = 0.911$) and implicit times (group effect: $F_{(2,26)} = 0.253$, $p = 0.778$) were similar among the three groups.

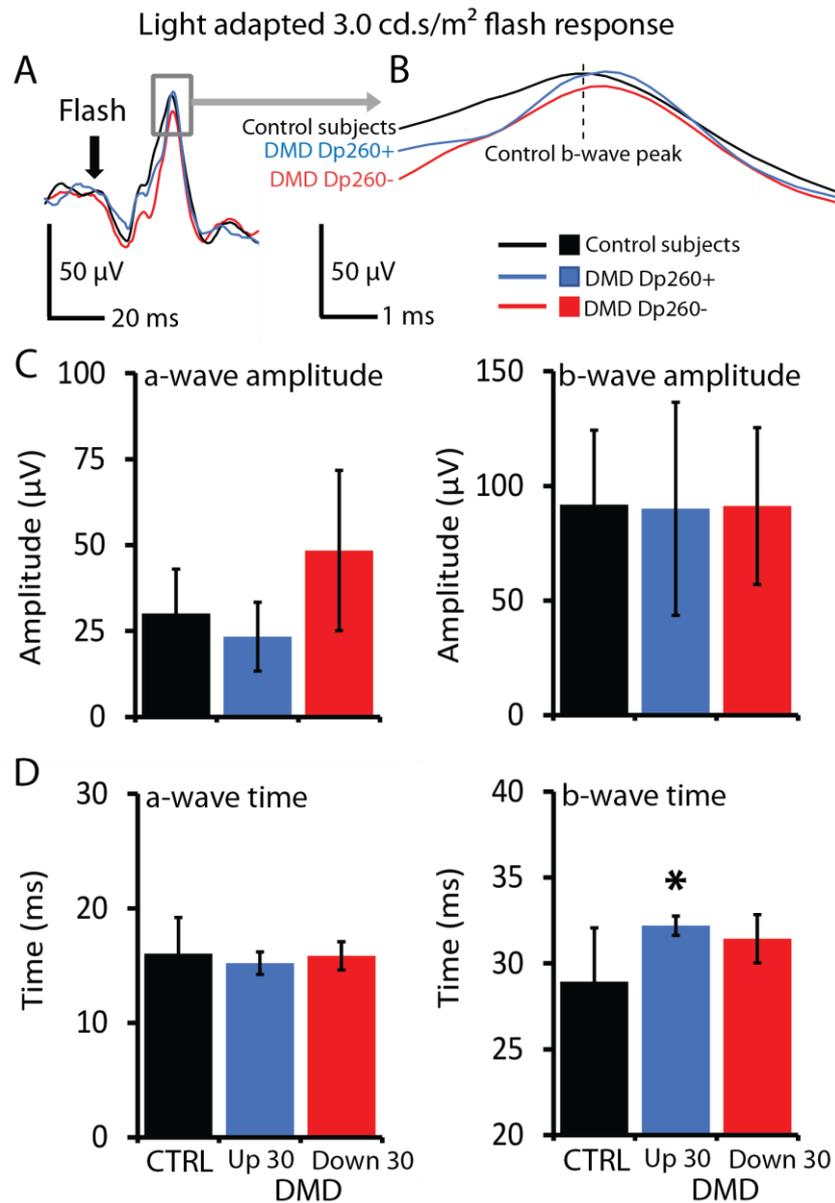


Figure 5. Light-adapted ERGs. Averaged traces (A: original responses; B: details of the b-wave) and mean (\pm one s.d.) amplitudes (C) and implicit times (D) are shown for controls (black symbols), DMD Up 30 (blue symbols), and DMD Down 30 (red symbols) patients in the light-adapted protocol. *significant difference ($p < 0.05$) compared to the control group.

Figure 6 shows the course of cone (responses to red light, Figure 6A) and rod (responses to green light, Figure 6B) detection thresholds for one representative subject of each group. Observe that the cone thresholds are similar for all three subjects (Figure 6A). Accordingly, the dark-adapted cone thresholds, calculated by averaging stimulus luminances at the last minute of the first protocol, were statistically similar ($F_{(2,36)} = 0.388$, $p = 0.681$) among the three groups: control subjects (mean = -1.7 ± 0.5 log cd/m²), DMD Up 30 (mean = -1.8 ± 0.4 log cd/m²), and DMD Down 30 (mean = -2.0 ± 1.3 log cd/m²) patients. In addition, there was no group effect ($F_{(2,36)} = 1.634$, $p = 0.210$) when the same method was applied to calculate dark-adapted (initial) rod thresholds averaging stimulus luminances at the last minute of the first protocol. Although, DMD patients both DMD Up 30 (mean = -2.5 ± 0.6 log cd/m²) and DMD Down 30 (mean = -2.5 ± 1.4 log cd/m²) showed slightly elevated thresholds compared to control subjects (mean = -3.0 ± 0.5 log cd/m²). In contrast, Figure 6B shows that rod final thresholds were different between the three subjects. The dark-adapted rod thresholds, calculated by averaging stimulus luminances at the three last minute of the second set of measurements, were significantly elevated in DMD Down 30 patients (mean = -3.2 ± 1.1 log cd/m²; $p = 0.001$) compared to control subjects (mean = -4.2 ± 0.3 log cd/m²), but not compared with DMD Up 30 patients (mean = -3.8 ± 0.6 log cd/m²; $p = 0.130$). DMD Up 30 thresholds were statistically similar ($p = 0.566$) to control thresholds as well.

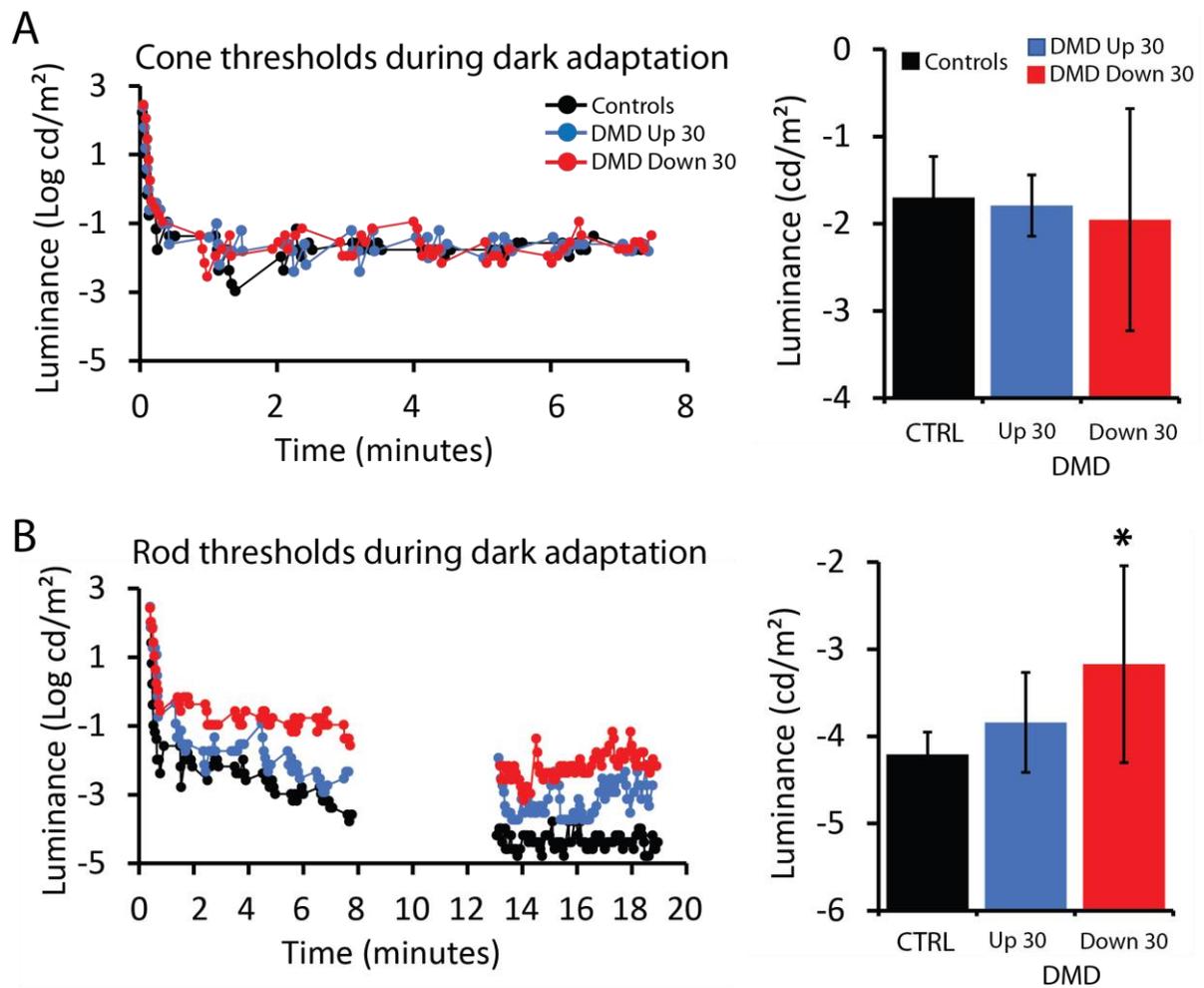


Figure 6. Course of detection thresholds during dark adaptation. Cone (A) and rod (B) thresholds as a function of time in the dark are shown for controls (black traces), DMD Up 30 (blue traces), and DMD Down 30 (red traces) patients. The traces are thresholds from representative subjects from each group. The right plots show means \pm 1 s.d. during the last minute of the cone thresholds and of the last three minutes of the rod thresholds. *significant difference ($p < 0.05$) compared to the control group.

Correlations

Properties of ERG components were correlated with visual thresholds to study if the electrophysiological and psychophysical deficits have common causes (Figure 7). As shown in Table 1, six DMD Down 30, four DMD up 30 patients participated in the ERG and the psychophysical measurements. Six normal subjects underwent both measurements. There were significant negative correlations between dark-adapted b-wave amplitudes to 0.01 cd.s/m² flashes and dark-adapted rod thresholds for patients (coefficient = -0.943, $p = 0.005$, Figure 7A) and DMD Up 30 patients (Figure 7B; due to the small sample size a statistical analysis was not performed), but not for control subjects owing to the small inter-individual variability (coefficient = -0.290, $p = 0.577$, Figure 7C). . Other ERG parameters were not correlated with dark-adapted cone or rod thresholds for any of the groups.

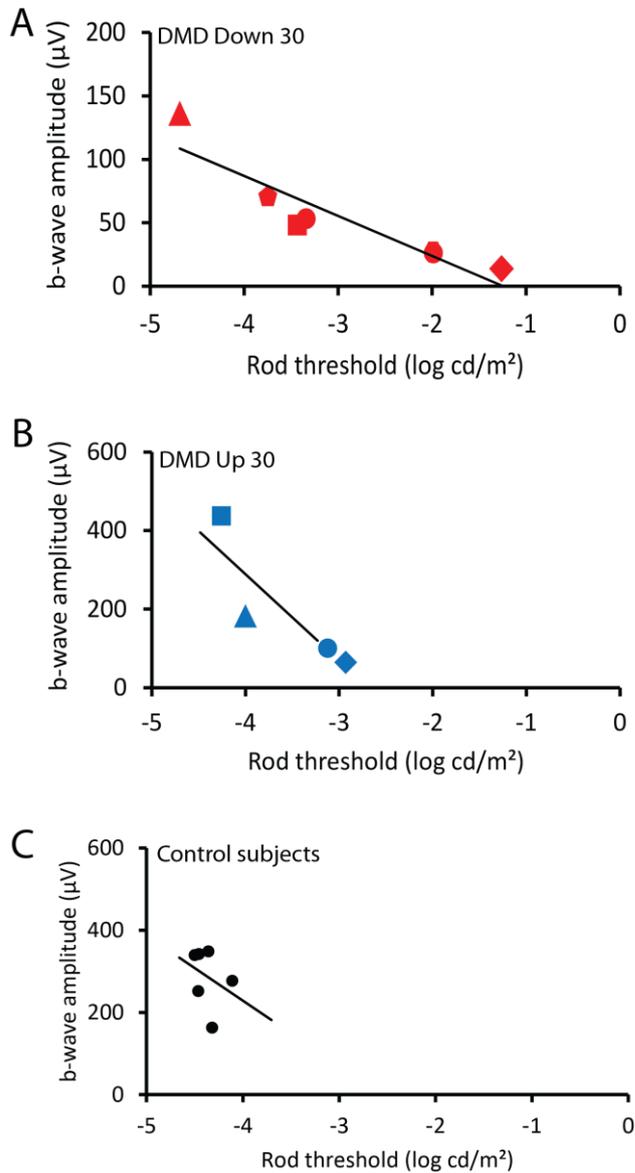


Figure 7. Correlations between dark-adapted ERG b-wave and rod threshold. b-wave amplitudes (μV) of ERG responses to $0.01 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ flashes plotted as a function of dark-adapted rod thresholds ($\log \text{ cd}/\text{m}^2$) for DMD Down 30 patients (A, $N = 6$), DMD Up 30 patients (B, $N = 4$), and control subjects (C, $N = 6$). A negative correlation was found for the patients but not for the normal subjects.

DISCUSSION

In the present study, a significant reduction in the dark-adapted b-wave amplitude of DMD Down 30 patients (lacking at least dystrophin protein Dp260 in addition to Dp427 alteration) and a significant increase of the light-adapted b-wave implicit time in DMD Up 30 patients (lacking only Dp427) were found when compared to control subjects. We also reported that psychophysical dark-adapted rod thresholds were significantly elevated in DMD Down 30 patients. An inverse correlation between b-wave amplitudes to 0.01 cd.s/m² flashes and rod thresholds was shown for the patients. These results offer new insights regarding cone and rod function in retinæ of DMD patients.

The dark-adapted ERG b-wave to 0.01 cd.s/m² flashes mainly reflects the integrity of the depolarizing On-bipolar cells of the rod system⁴⁰. This ERG component was found to be severely reduced (~30% of the control amplitude, in average) in DMD Down 30 patients, emphasizing the role that Dp260 plays in the rod to rod-bipolar cell synapse. In addition, the reduced b-wave with preserved a-wave of the 3.0 cd.s/m² flash (electronegative) ERG, as found in several conditions affecting the outer retina⁴¹⁻⁵² confirms this notion. The correlation between the decreased b-wave in the ERG responses to the dim flash and the psychophysical rod thresholds after dark-adaptation strongly suggests that the alterations at the rod synapse also caused the threshold elevations in DMD patients.

The dark-adapted ERG a-wave to standard flash depends on photoreceptor as well as post-receptoral integrity⁵³⁻⁵⁵. A strong flash (10 cd.s/m² and above) allows enhancing a-waves reflecting photoreceptor function⁵⁶, since at this flash strength the a-wave reflect rod sensitivity, not depending so much on post-receptoral interactions⁵⁴. DMD Down 30 patients showed delayed a-wave peak to the dark-adapted 10 cd.s/m² flash ERG indicating that *DMD*

gene mutations is associated with photoreceptor dysfunction at the outer nuclear layer with, presumably, unaffected photoreceptor outer segment (phototransduction) function.

Primate light-adapted (photopic or cone) ERG a-wave may reflect cone integrity and also function of the post-receptor hyperpolarizing (Off-bipolar and horizontal cells) neurons⁵⁷. DMD patients showed normal to slightly enhanced light-adapted ERG a-wave amplitudes with normal implicit times, as previously described^{17,24–26}. The light-adapted ERG b-wave originating from post-receptor cells of the cone system was delayed, as previously reported, in DMD patients¹⁷. It may reflect unbalanced post-receptor (On-bipolar and Off-bipolar cells) function⁵⁸ that in turn may reflect a slow activation of the On-bipolar cells⁵⁹.

The present data showed that *DMD* gene alterations presumably affecting the expression of the retinal dystrophin protein Dp260 (DMD Down 30 patients) is associated with preserved dark-adapted cone thresholds and elevated dark-adapted rod thresholds without symptoms of nyctalopia or bradyopsia. As reported by Bijveld et al., near to absent symptoms of night vision disturbances with about 3 log unit elevated rod thresholds can be observed in patients with the complete type of congenital stationary night blindness (cCSNB or CSNB1). The authors argued that visual symptoms may not be perceived by several of cCSNB patients because vision is disturbed only in very dark circumstances that are usually not experienced in modern daily routine⁶⁰. It may also explain why DMD patients do not complain about their night vision²⁵.

Interestingly, unaffected dark-adapted visual sensitivity recovery after photobleaching has been reported in DMD patients with altered ERGs^{21,39}. In the first study showing dark-adapted thresholds in DMD patients³⁹, a few subjects were tested and only three patients displayed the characteristic negative ERG. In the second study²¹, eight boys with genetic alteration downstream exon 44 presumably affecting Dp427 and Dp260 showed normal dark-adaptation, but Becker muscular dystrophy (BMD) patients, displaying milder phenotype than

DMD patients due to the ability of the *DMD* gene to produce some functional dystrophin protein, were included in the study.

The discrepancy between our results and previously reported results^{21,39} may be partially because of methodological differences to record dark-adapted thresholds. We measured dark-adapted cone (red light) and rod (green light) thresholds separately while the dark-adaptation thresholds to presumably white light has been previously measured. Alternatively or in addition, only genetically characterized DMD patients have been examined in the present study while, previously, either DMD patients without genetic information³⁹ or pooled DMD and BMD patients²¹ were studied.

We recognize that our protocol to measure dark-adapted cone and rod thresholds is a short (adapted) version of the original (~40 minutes) protocol that we have developed as an attempt to make the examination tolerable by the young patients and controls studied here (Nagy et al. 2017 IOVS 58: 5408 e-abstract). Future investigations could consider measuring final rod threshold after long dark-adapted intervals, as in our protocols it was limited to approximately 20 minutes of dark adaptation, same adaptation time used to measure the ERG b-wave to weak flash. However, we believe that a longer protocol would not change the sensitivity level arrived at 20 minutes of dark adaptation, at least with the bleaching strength we used. We found the thresholds to be stable at the end of the second protocol, (mean slope of linear regression at the last four minutes of the second series: controls = -0.0002 ± 0.0006 ; DMD Up 30 = -0.0004 ± 0.0023 ; DMD Down 30 = 0.003 ± 0.002)

Regarding DMD causing asymmetric cone versus rod system dysfunction, we hypothesize that either compensatory functional mechanisms of the retina, perhaps provided by Off-bipolar cells spared in DMD patients^{18,36}, or alternative retinal mechanisms for regenerating cone visual pigments⁶¹ would guarantee relatively preserved light-adapted ERGs and normal dark-adapted cone thresholds.

CONCLUSIONS

Although the knowledge about affected versus preserved neural processes in the DMD affected retina contributes substantially to understand the pathophysiology of this retinal disease, ERG changes are not necessarily associated with detectable visual losses. For instance, severe dark-adapted and slight light-adapted ERG alterations caused by *DMD* gene mutations are not related to any obvious visual symptom. However, red-green color vision impairment³⁷ and contrast sensitivity losses^{36,38} revealed that the cone pathway is affected in DMD patients. In addition, we have now reported that rod sensitivity is also affected and, moreover, it correlates with the severe dark-adapted (scotopic or rod driven) ERG deficits which is the classical non-muscular sign of DMD. Dark-adapted rod threshold could be used to evaluate the efficacy of future treatments to rescue the expression of dystrophin proteins in the central nervous system.

ACKNOWLEDGEMENT

We would like to express our thanks to Mayana Zatz and Rita Pavanello from the “Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-tronco” (University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil) for the genetic tests and all the patients and their families who kindly consented to participate in this study.

REFERENCES

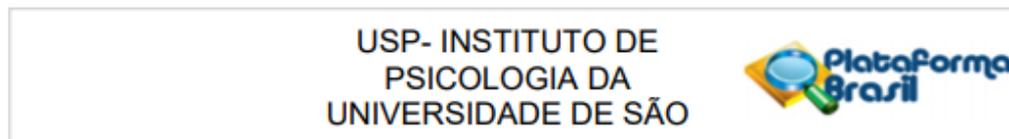
1. Hoffman, EP, Brown, RH and Kunkel, LM (1987). Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* **51**: 919–928.
2. Koenig, M, Hoffman, EP, Bertelson, CJ, Monaco, AP, Feener, C and Kunkel, LM (1987). Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* **50**: 509–517.

3. Chelly, J, Gilgenkrantz, H, Lambert, M, Hamard, G, Chafey, P, Récan, D, *et al.* (1990). Effect of dystrophin gene deletions on mRNA levels and processing in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Cell* **63**: 1239–1248.
4. Lidov, HG, Byers, TJ, Watkins, SC and Kunkel, LM (1990). Localization of dystrophin to postsynaptic regions of central nervous system cortical neurons. *Nature* **348**: 725–728.
5. Cibis, GW, Fitzgerald, KM, Harris, DJ, Rothberg, PG and Rupani, M (1993). The effects of dystrophin gene mutations on the ERG in mice and humans. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **34**: 3646–3652.
6. Pillers, DA, Bulman, DE, Weleber, RG, Sigesmund, DA, Musarella, MA, Powell, BR, *et al.* (1993). Dystrophin expression in the human retina is required for normal function as defined by electroretinography. *Nat. Genet.* **4**: 82–86.
7. Claudepierre, T, Rodius, F, Frasson, M, Fontaine, V, Picaud, S, Dreyfus, H, *et al.* (1999). Differential distribution of dystrophins in rat retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **40**: 1520–1529.
8. D'Souza, VN, Nguyen, TM, Morris, GE, Karges, W, Pillers, DA and Ray, PN (1995). A novel dystrophin isoform is required for normal retinal electrophysiology. *Hum. Mol. Genet.* **4**: 837–842.
9. Kameya, S, Araki, E, Katsuki, M, Mizota, A, Adachi, E, Nakahara, K, *et al.* (1997). Dp260 disrupted mice revealed prolonged implicit time of the b-wave in ERG and loss of accumulation of beta-dystroglycan in the outer plexiform layer of the retina. *Hum. Mol. Genet.* **6**: 2195–2203.
10. Miike, T, Miyatake, M, Zhao, J, Yoshioka, K and Uchino, M (1989). Immunohistochemical dystrophin reaction in synaptic regions. *Brain Dev.* **11**: 344–346.
11. Miyatake, M, Miike, T, Zhao, JE, Yoshioka, K, Uchino, M and Usuku, G (1991). Dystrophin: localization and presumed function. *Muscle Nerve* **14**: 113–119.
12. Schmitz, F and Drenckhahn, D (1997). Dystrophin in the retina. *Prog. Neurobiol.* **53**: 547–560.
13. Wersinger, E, Bordais, A, Schwab, Y, Sene, A, Bénard, R, Alunni, V, *et al.* (2011). Reevaluation of dystrophin localization in the mouse retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **52**: 7901–7908.
14. Ahn, AH and Kunkel, LM (1993). The structural and functional diversity of dystrophin. *Nat. Genet.* **3**: 283–291.
15. Austin, RC, Howard, PL, D'Souza, VN, Klamut, HJ and Ray, PN (1995). Cloning and characterization of alternatively spliced isoforms of Dp71. *Hum. Mol. Genet.* **4**: 1475–1483.
16. Cibis, GW and Fitzgerald, KM (2001). The negative ERG is not synonymous with nightblindness. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* **99**: 171–175; discussion 175–176.
17. De Becker, I, Riddell, DC, Dooley, JM and Tremblay, F (1994). Correlation between electroretinogram findings and molecular analysis in the Duchenne muscular dystrophy phenotype. *Br. J. Ophthalmol.* **78**: 719–722.
18. Fitzgerald, KM, Cibis, GW, Giambrone, SA and Harris, DJ (1994). Retinal signal transmission in Duchenne muscular dystrophy: evidence for dysfunction in the photoreceptor/depolarizing bipolar cell pathway. *J. Clin. Invest.* **93**: 2425–2430.
19. Girlanda, P, Quartarone, A, Buceti, R, Sinicropi, S, Macaione, V, Saad, FA, *et al.* (1997). Extra-muscle involvement in dystrophinopathies: an electroretinography and evoked potential study. *J. Neurol. Sci.* **146**: 127–132.
20. Ino-ue, M, Honda, S, Nishio, H, Matsuo, M, Nakamura, H and Yamamoto, M (1997). Genotype and electroretinal heterogeneity in Duchenne muscular dystrophy. *Exp. Eye Res.* **65**: 861–864.

21. Jensen, H, Warburg, M, Sjö, O and Schwartz, M (1995). Duchenne muscular dystrophy: negative electroretinograms and normal dark adaptation. Reappraisal of assignment of X linked incomplete congenital stationary night blindness. *J. Med. Genet.* **32**: 348–351.
22. Pascual Pascual, SI, Molano, J and Pascual-Castroviejo, I (1998). Electroretinogram in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Pediatr. Neurol.* **18**: 315–320.
23. Pillers, DA, Fitzgerald, KM, Duncan, NM, Rash, SM, White, RA, Dwinnell, SJ, *et al.* (1999). Duchenne/Becker muscular dystrophy: correlation of phenotype by electroretinography with sites of dystrophin mutations. *Hum. Genet.* **105**: 2–9.
24. Ricotti, V, Jäggle, H, Theodorou, M, Moore, AT, Muntoni, F and Thompson, DA (2016). Ocular and neurodevelopmental features of Duchenne muscular dystrophy: a signature of dystrophin function in the central nervous system. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* **24**: 562–568.
25. Sigesmund, DA, Weleber, RG, Pillers, DA, Westall, CA, Panton, CM, Powell, BR, *et al.* (1994). Characterization of the ocular phenotype of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Ophthalmology* **101**: 856–865.
26. Tremblay, F, De Becker, I, Dooley, JM and Riddell, DC (1994). Duchenne muscular dystrophy: negative scotopic bright-flash electroretinogram but not congenital stationary night blindness. *Can. J. Ophthalmol. J. Can. Ophthalmol.* **29**: 274–279.
27. Bucher, F, Friedlander, MS, Aguilar, E, Kurihara, T, Krohne, TU, Usui, Y, *et al.* (2019). The long dystrophin gene product Dp427 modulates retinal function and vascular morphology in response to age and retinal ischemia. *Neurochem. Int.*: 104489 doi:10.1016/j.neuint.2019.104489.
28. Pillers, DA, Weleber, RG, Woodward, WR, Green, DG, Chapman, VM and Ray, PN (1995). mdxCv3 mouse is a model for electroretinography of Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **36**: 462–466.
29. Pillers, DA, Weleber, RG, Green, DG, Rash, SM, Dally, GY, Howard, PL, Powers, MR, Hood, DC, *et al.* (1999). Effects of dystrophin isoforms on signal transduction through neural retina: genotype-phenotype analysis of duchenne muscular dystrophy mouse mutants. *Mol. Genet. Metab.* **66**: 100–110.
30. Tsai, TI, Barboni, MTS, Nagy, BV, Roux, MJ, Rendon, A, Ventura, DF, *et al.* (2016). Asymmetrical Functional Deficits of ON and OFF Retinal Processing in the mdx3Cv Mouse Model of Duchenne Muscular Dystrophy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **57**: 5788–5798.
31. Muntoni, F, Torelli, S and Ferlini, A (2003). Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol.* **2**: 731–740.
32. Doorenweerd, N (2020). Combining genetics, neuropsychology and neuroimaging to improve understanding of brain involvement in Duchenne muscular dystrophy - a narrative review. *Neuromuscul. Disord. NMD* **30**: 437–442.
33. Ricotti, V, Mandy, WPL, Scoto, M, Pane, M, Deconinck, N, Messina, S, *et al.* (2016). Neurodevelopmental, emotional, and behavioural problems in Duchenne muscular dystrophy in relation to underlying dystrophin gene mutations. *Dev. Med. Child Neurol.* **58**: 77–84.
34. Barboni, MTS, Vaillend, C, Joachimsthaler, A, Liber, AMP, Khabou, H, Roux, MJ, *et al.* (2020). Rescue of Defective Electroretinographic Responses in Dp71-Null Mice With AAV-Mediated Reexpression of Dp71. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **61**: 11.
35. Schmitz, F and Drenckhahn, D (1997). Localization of dystrophin and beta-dystroglycan in bovine retinal photoreceptor processes extending into the postsynaptic dendritic complex. *Histochem. Cell Biol.* **108**: 249–255.

36. Barboni, MTS, Nagy, BV, de Araújo Moura, AL, Damico, FM, da Costa, MF, Kremers, J, *et al.* (2013). ON and OFF electroretinography and contrast sensitivity in Duchenne muscular dystrophy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **54**: 3195–3204.
37. Costa, MF, Oliveira, AGF, Feitosa-Santana, C, Zatz, M and Ventura, DF (2007). Red-green color vision impairment in Duchenne muscular dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* **80**: 1064–1075.
38. Costa, MF, Barboni, MTS and Ventura, DF (2011). Psychophysical measurements of luminance and chromatic spatial and temporal contrast sensitivity in Duchenne muscular dystrophy. *Psychol. Amp Neurosci.* **4**: 67–74.
39. Tremblay, F, De Becker, I, Riddell, DC and Dooley, JM (1994). Duchenne muscular dystrophy: negative scotopic bright-flash electroretinogram and normal dark adaptation. *Can. J. Ophthalmol. J. Can. Ophtalmol.* **29**: 280–283.
40. Frishman, LJ (2006). Origins of the electroretinogram. *Princ. Pract. Clin. Electrophysiol. Vis.*, MIT Press, Cambridge: pp 139–183.
41. Alexander, KR, Fishman, GA, Barnes, CS and Grover, S (2001). On-response deficit in the electroretinogram of the cone system in X-linked retinoschisis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **42**: 453–459.
42. Barnes, CS, Alexander, KR and Fishman, GA (2002). A distinctive form of congenital stationary night blindness with cone ON-pathway dysfunction. *Ophthalmology* **109**: 575–583.
43. Carr, RE (1974). Congenital stationary nightblindness. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* **72**: 448–487.
44. Hotta, K, Kondo, M, Nakamura, M, Hotta, J, Terasaki, H, Miyake, Y, *et al.* (2006). Negative electroretinograms in pericentral pigmentary retinal degeneration. *Clin. Experiment. Ophthalmol.* **34**: 89–92.
45. Lei, B, Bush, RA, Milam, AH and Sieving, PA (2000). Human melanoma-associated retinopathy (MAR) antibodies alter the retinal ON-response of the monkey ERG in vivo. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **41**: 262–266.
46. Martemyanov, KA and Sampath, AP (2017). The Transduction Cascade in Retinal ON-Bipolar Cells: Signal Processing and Disease. *Annu. Rev. Vis. Sci.* **3**: 25–51.
47. Miyake, Y, Yagasaki, K, Horiguchi, M, Kawase, Y and Kanda, T (1986). Congenital stationary night blindness with negative electroretinogram. A new classification. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill 1960* **104**: 1013–1020.
48. Pardue, MT, McCall, MA, LaVail, MM, Gregg, RG and Peachey, NS (1998). A naturally occurring mouse model of X-linked congenital stationary night blindness. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **39**: 2443–2449.
49. Pardue, MT and Peachey, NS (2014). Mouse b-wave mutants. *Doc. Ophthalmol. Adv. Ophthalmol.* **128**: 77–89.
50. Sergouniotis, PI, Robson, AG, Li, Z, Devery, S, Holder, GE, Moore, AT, *et al.* (2012). A phenotypic study of congenital stationary night blindness (CSNB) associated with mutations in the GRM6 gene. *Acta Ophthalmol. (Copenh.)* **90**: e192-197.
51. Shinoda, K, Ohde, H, Mashima, Y, Inoue, R, Ishida, S, Inoue, M, *et al.* (2001). On- and off-responses of the photopic electroretinograms in X-linked juvenile retinoschisis. *Am. J. Ophthalmol.* **131**: 489–494.
52. Vincent, A, Robson, AG, Neveu, MM, Wright, GA, Moore, AT, Webster, AR, *et al.* (2013). A phenotype-genotype correlation study of X-linked retinoschisis. *Ophthalmology* **120**: 1454–1464.
53. Hood, DC and Birch, DG (1990). The A-wave of the human electroretinogram and rod receptor function. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **31**: 2070–2081.

54. Robson, JG and Frishman, LJ (2014). The rod-driven a-wave of the dark-adapted mammalian electroretinogram. *Prog. Retin. Eye Res.* **0**: 1–22.
55. Rodieck, RW (1972). Components of the electroretinogram--a reappraisal. *Vision Res.* **12**: 773–780.
56. McCulloch, DL, Marmor, MF, Brigell, MG, Hamilton, R, Holder, GE, Tzekov, R, *et al.* (2015). ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2015 update). *Doc. Ophthalmol. Adv. Ophthalmol.* **130**: 1–12.
57. Bush, RA and Sieving, PA (1994). A proximal retinal component in the primate photopic ERG a-wave. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **35**: 635–645.
58. Sieving, PA, Murayama, K and Naarendorp, F (1994). Push-pull model of the primate photopic electroretinogram: a role for hyperpolarizing neurons in shaping the b-wave. *Vis. Neurosci.* **11**: 519–532.
59. Roux, M, Philipps, A, Chapot, C, Sahel, J and Rendon, A (2013). Alterations in the mGluR6 signaling complex in the retina of mdx3Cv mice, a model of Duchenne Muscular Disease. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **54**: 5084–5084.
60. Bijveld, MMC, van Genderen, MM, Hoeben, FP, Katzin, AA, van Nispen, RMA, Riemsdag, FCC, *et al.* (2013). Assessment of night vision problems in patients with congenital stationary night blindness. *PloS One* **8**: e62927.
61. Morshedean, A, Kaylor, JJ, Ng, SY, Tsan, A, Frederiksen, R, Xu, T, *et al.* (2019). Light-Driven Regeneration of Cone Visual Pigments through a Mechanism Involving RGR Opsin in Müller Glial Cells. *Neuron* **102**: 1172-1183.e5.

ANEXOS**ANEXO I****Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa****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

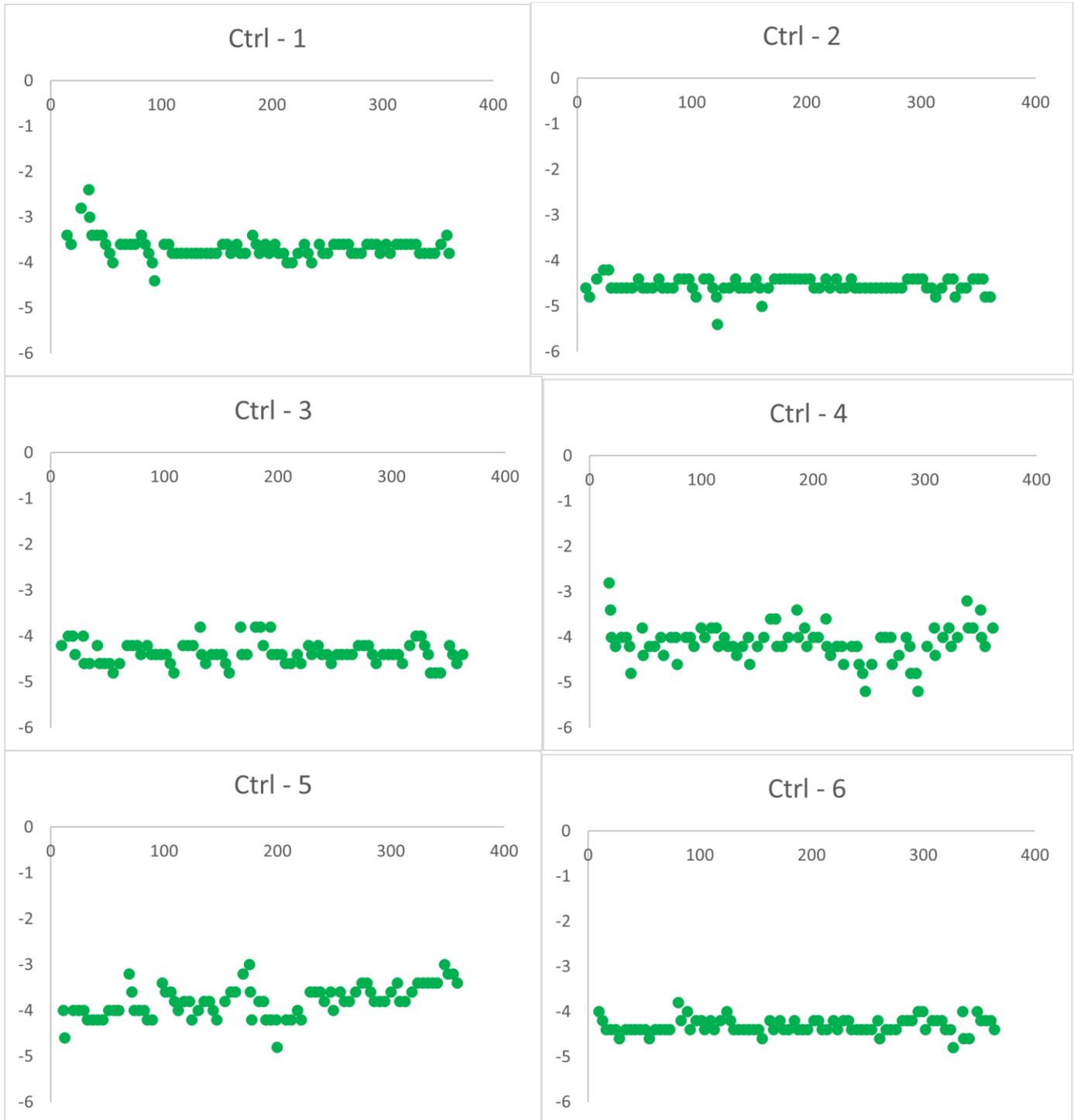
Número do Parecer: 2.606.745

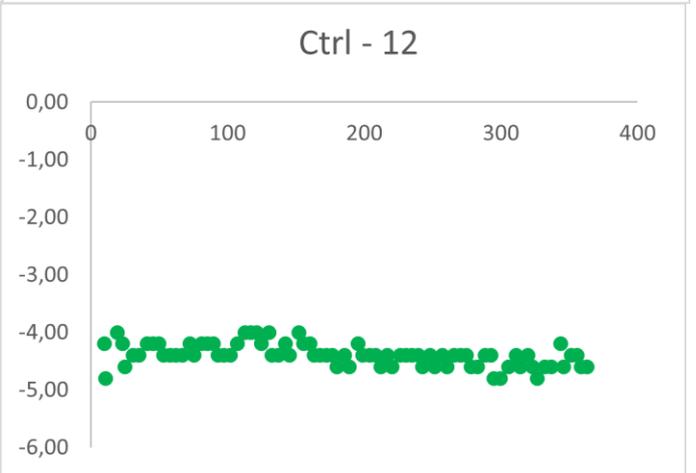
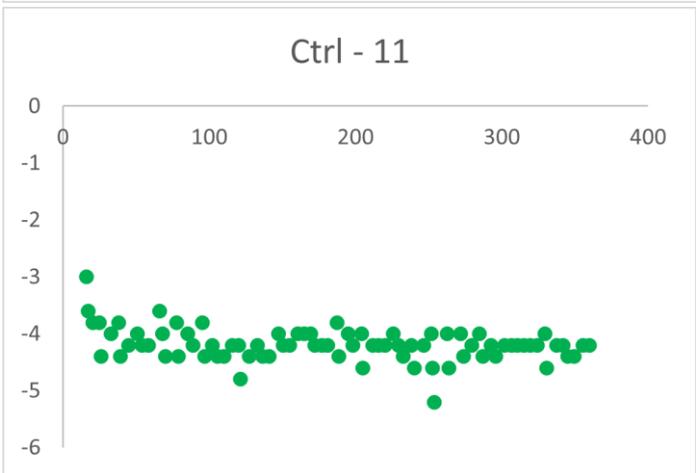
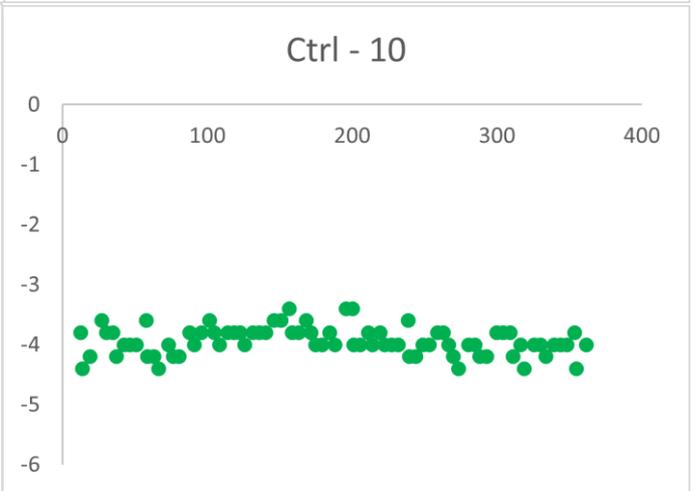
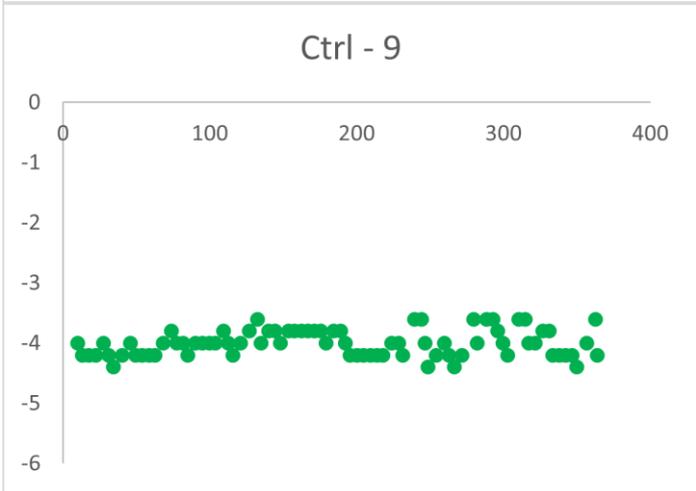
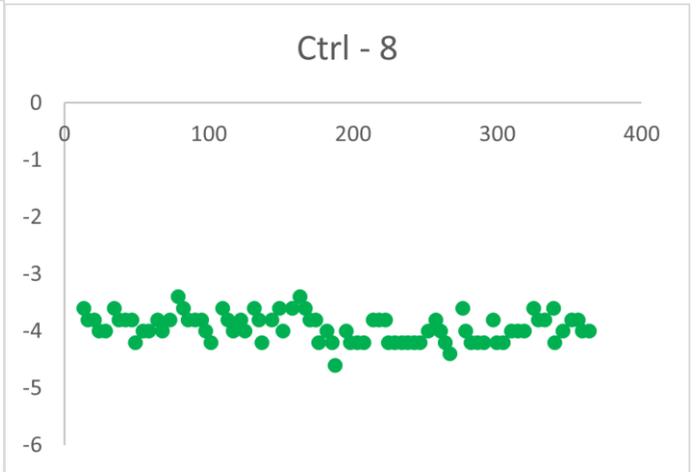
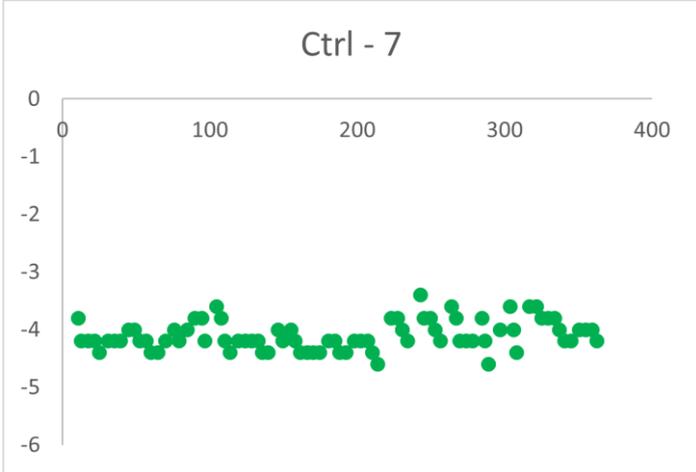
Apresentação do Projeto:

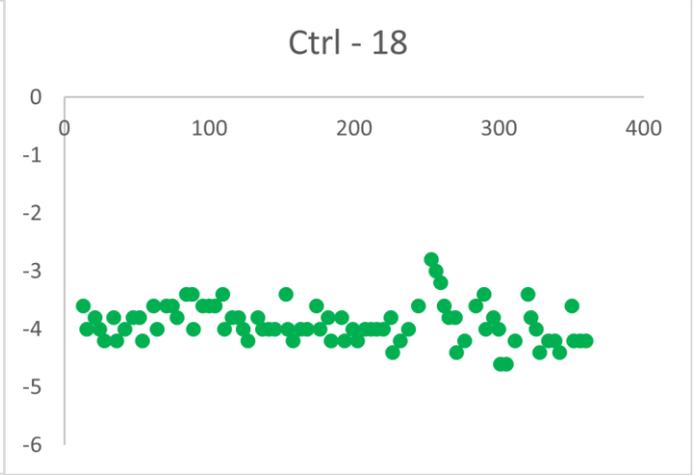
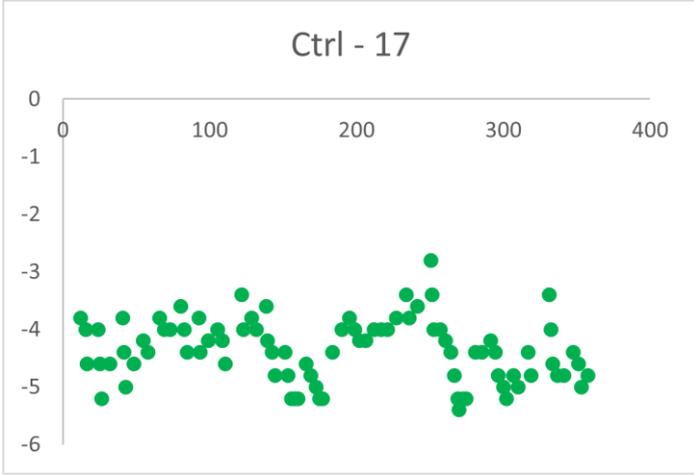
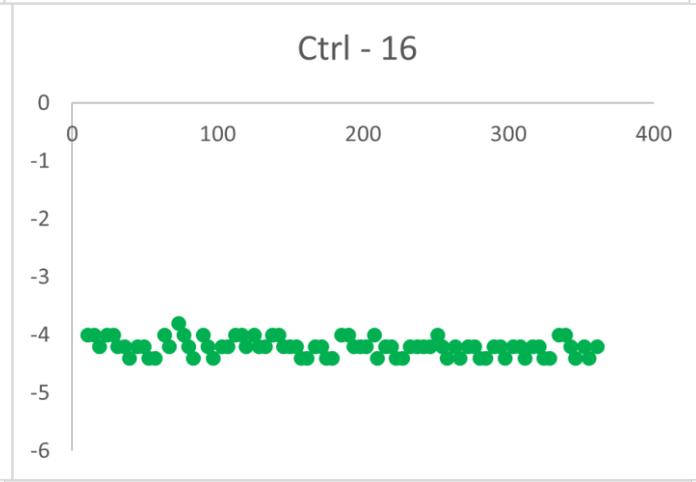
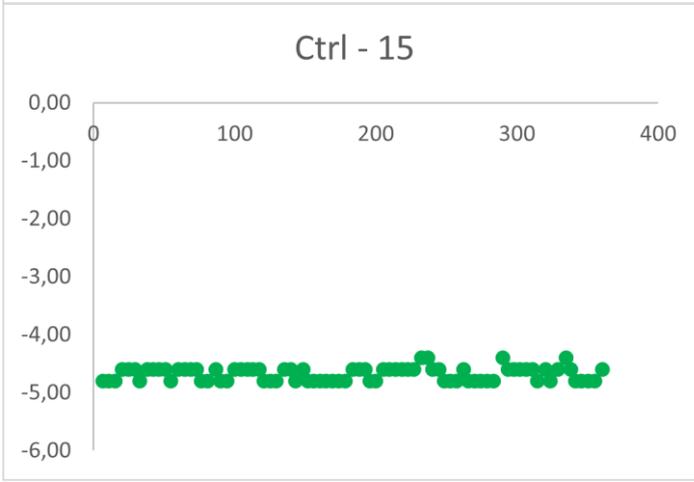
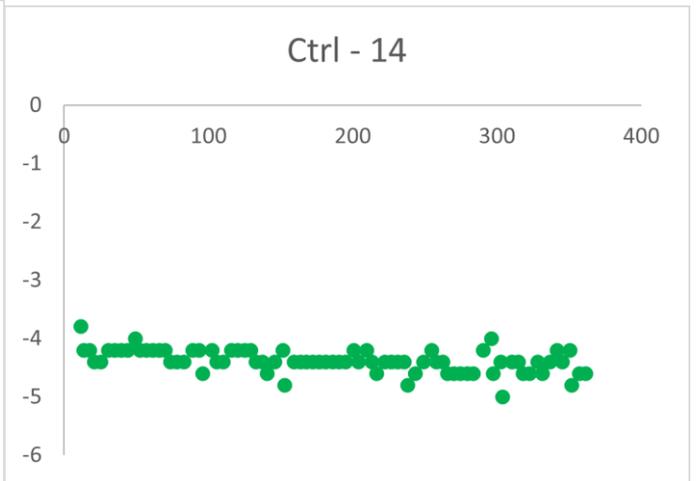
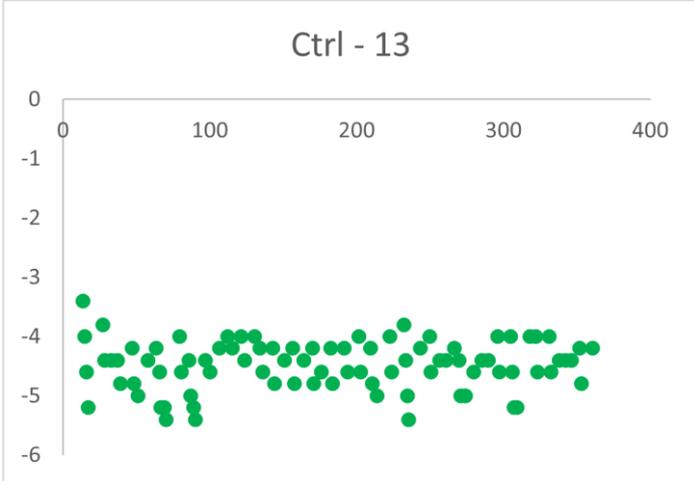
Este estudo assinala que contribuirá para o avanço na compreensão dos aspectos funcionais do processamento visual em pacientes com alterações no gene dmd, pela utilização de novas tecnologias de investigação clínica não invasiva (novos protocolos de estimulação visual e um sistema portátil de dispositivos 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.

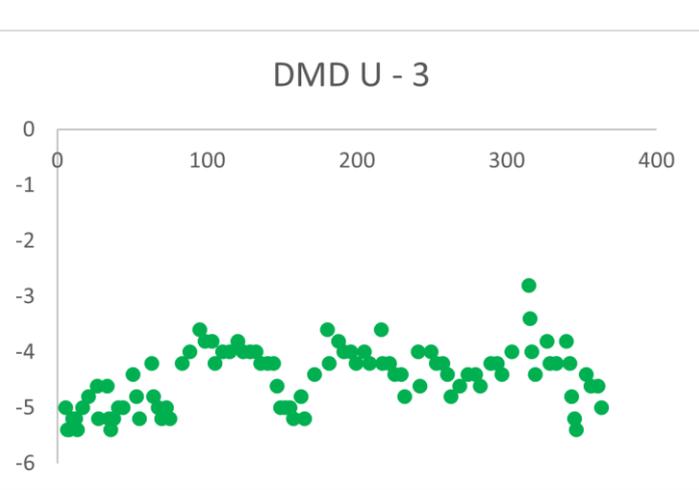
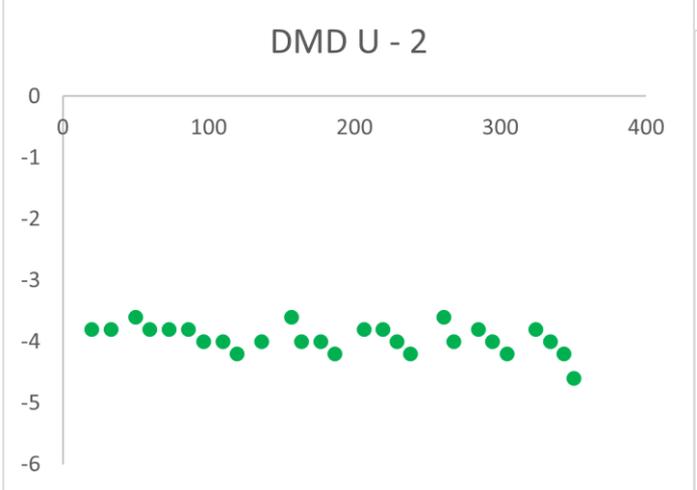
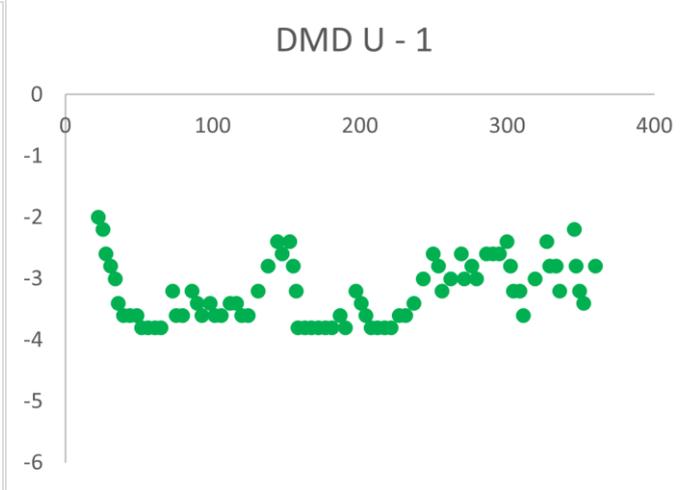
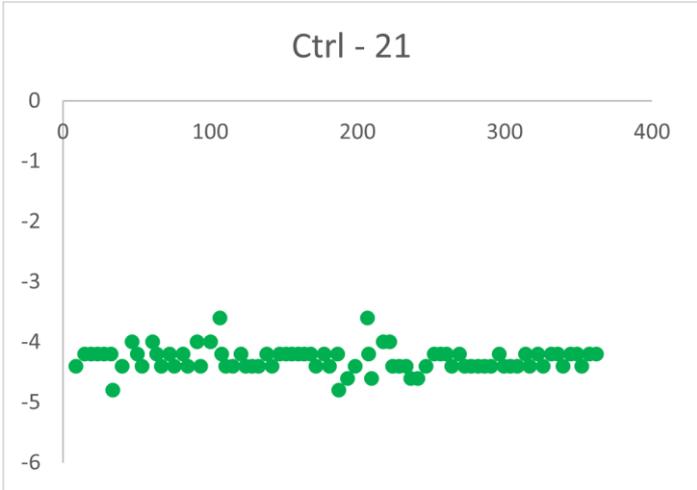
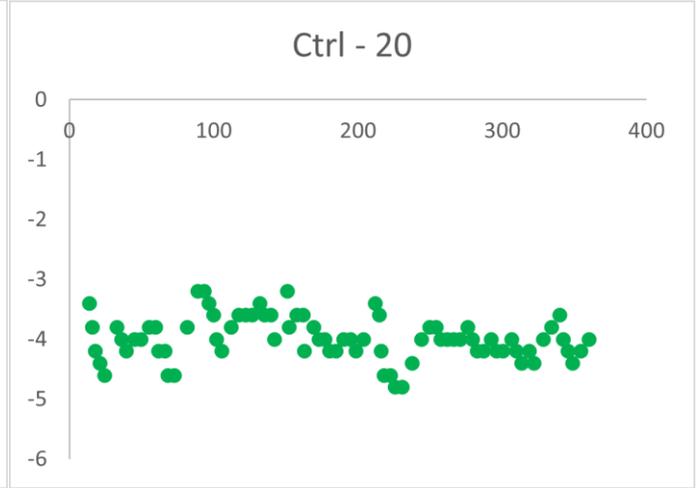
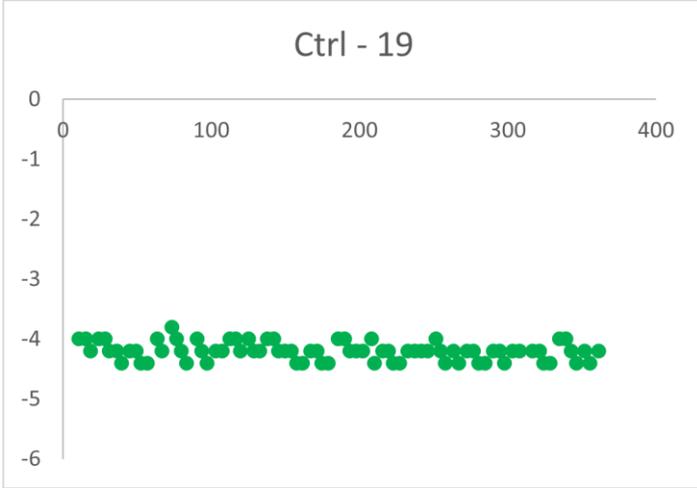
ANEXO II

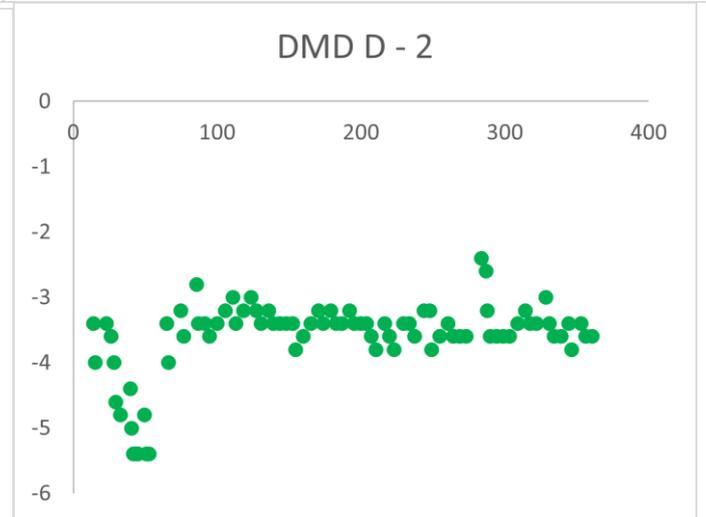
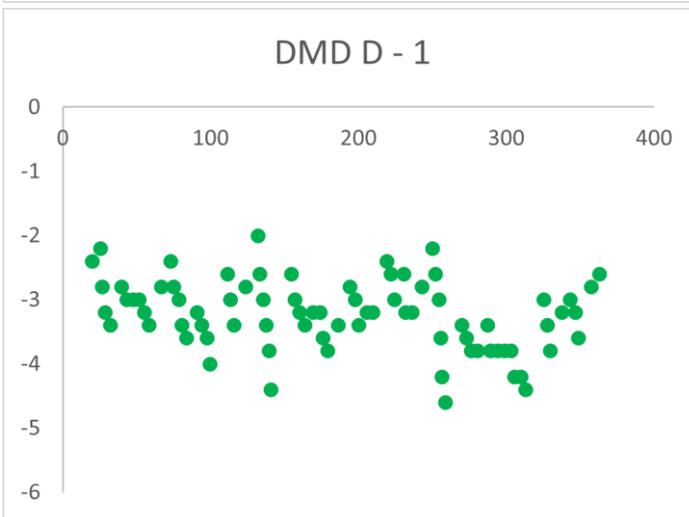
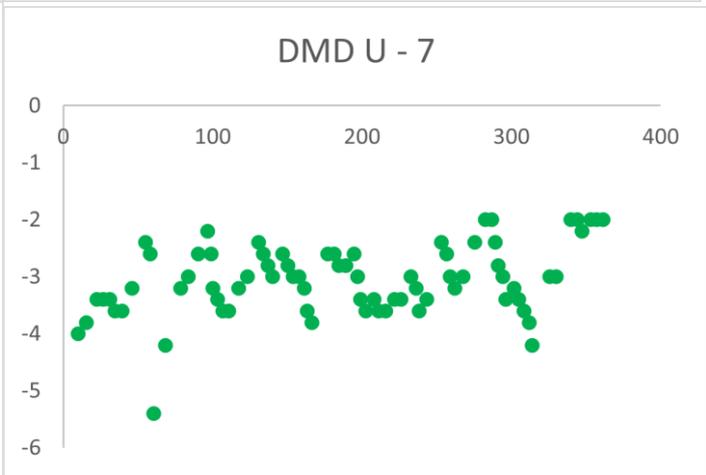
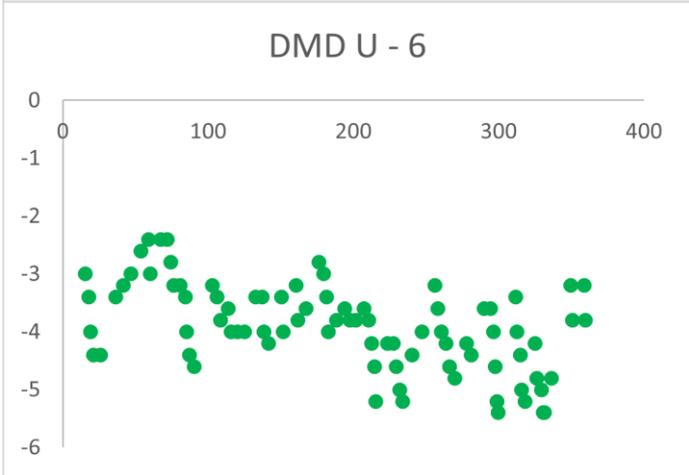
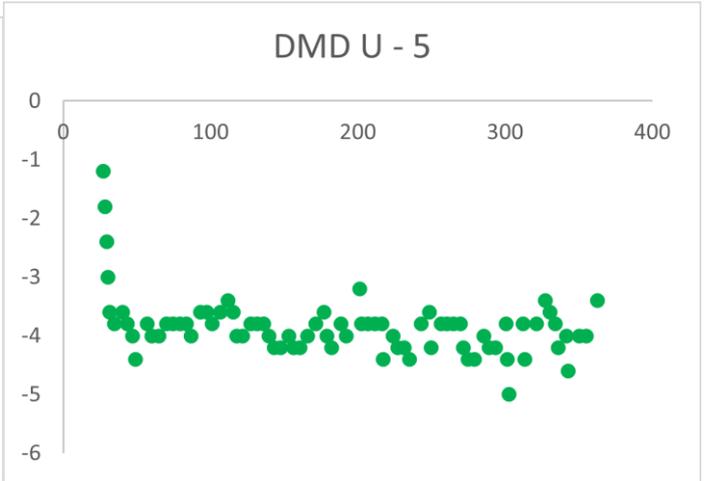
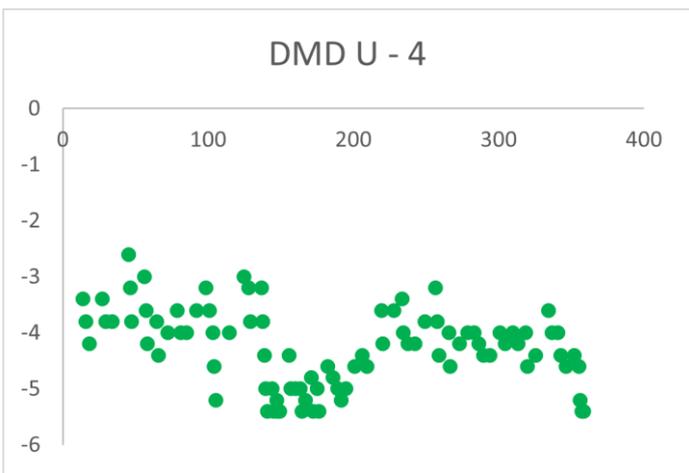
Gráficos individuais do protocolo total dos bastonetes - 6 min
eixo Y = $\log \text{cd/m}^2$ e eixo X = tempo em seg

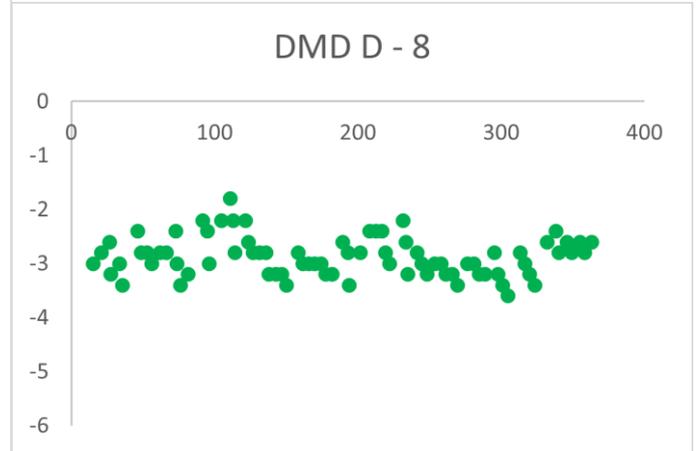
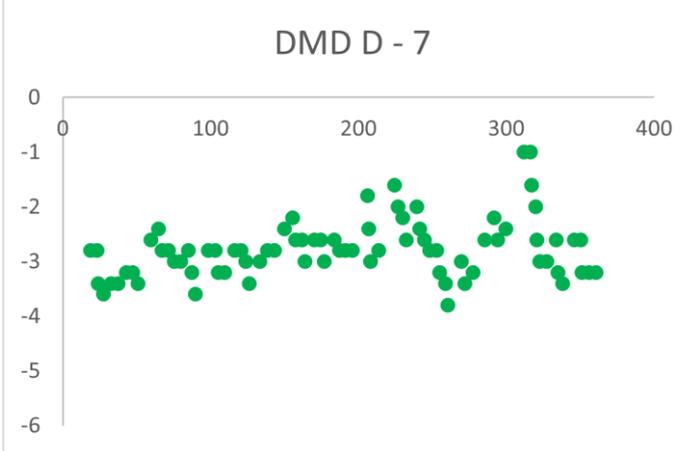
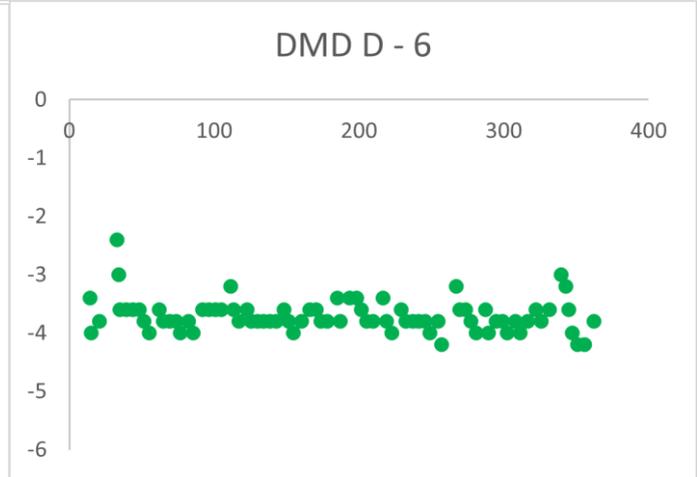
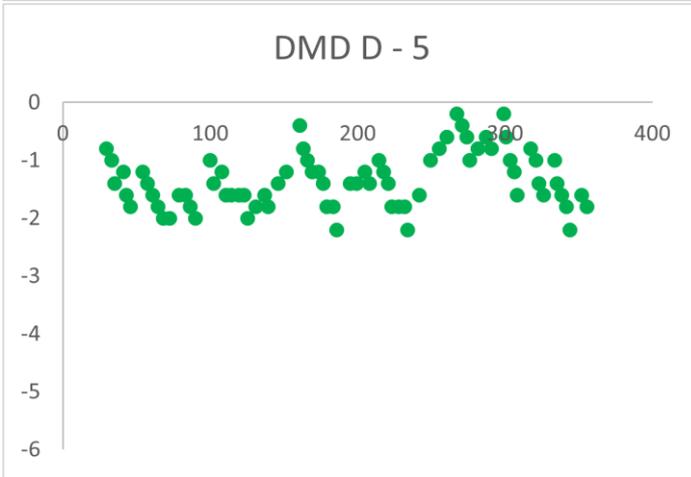
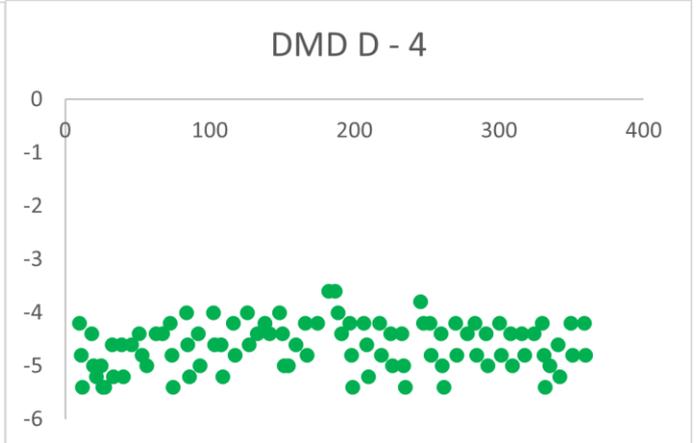
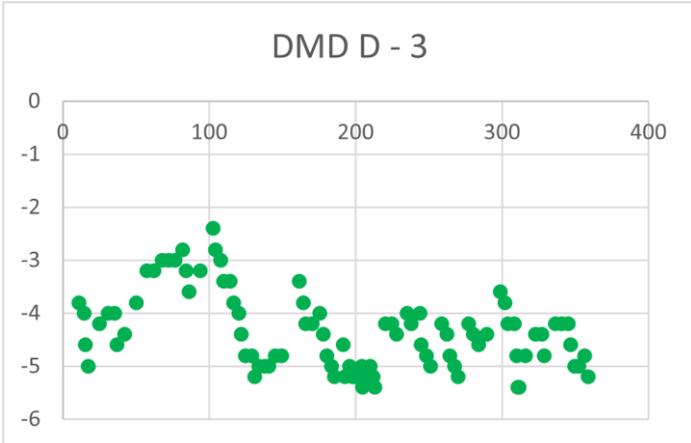


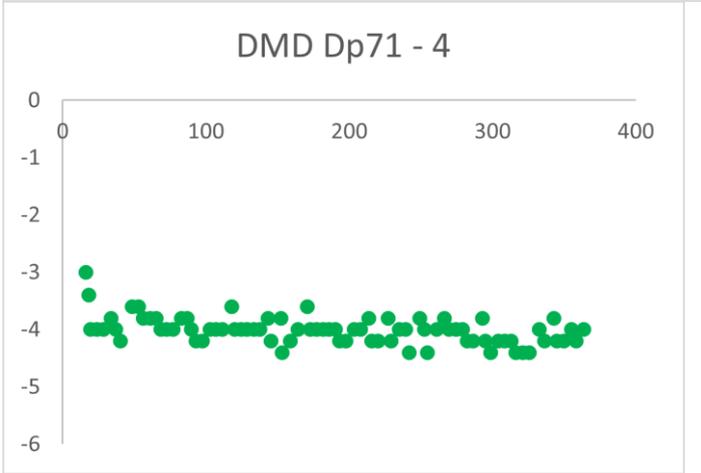
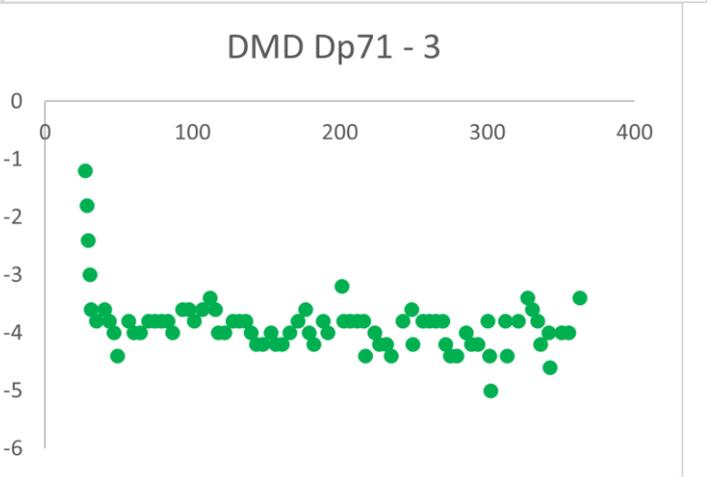
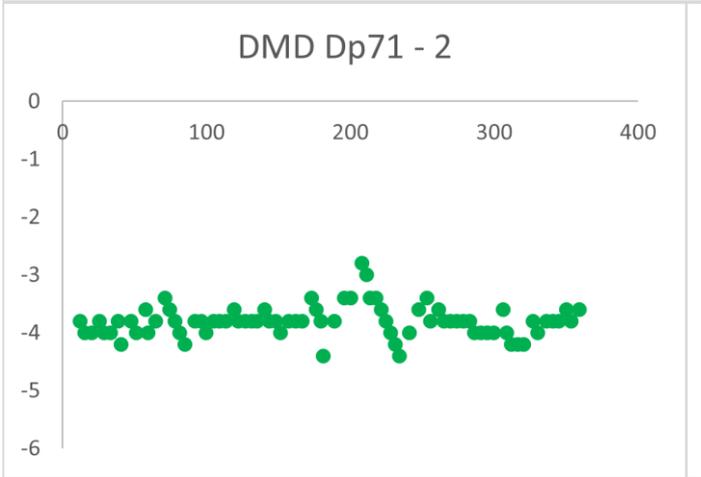
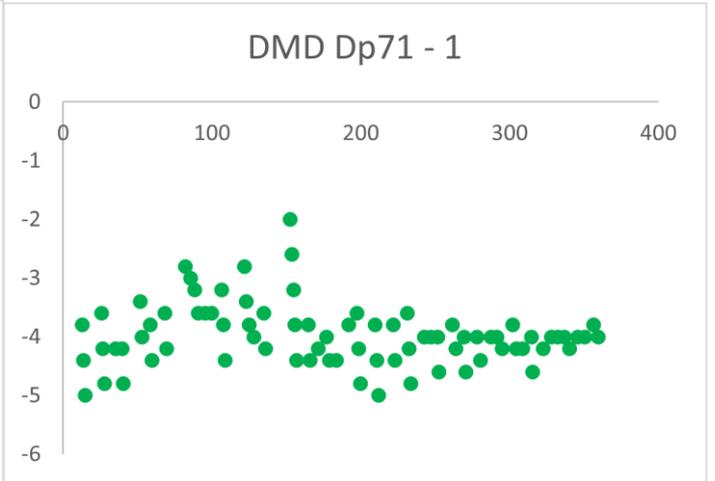
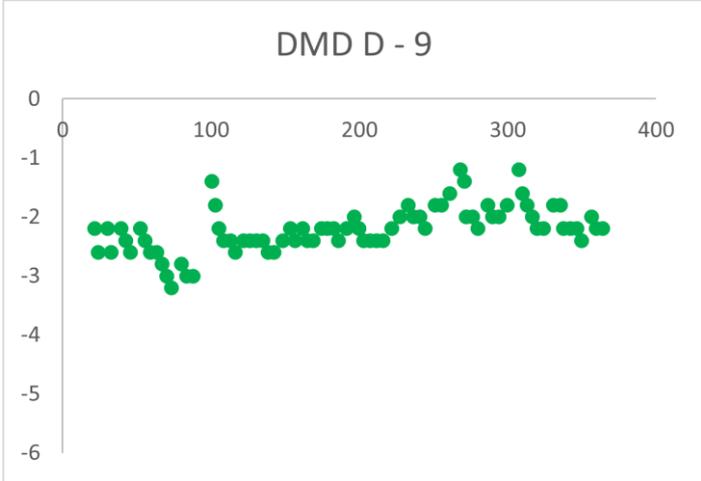






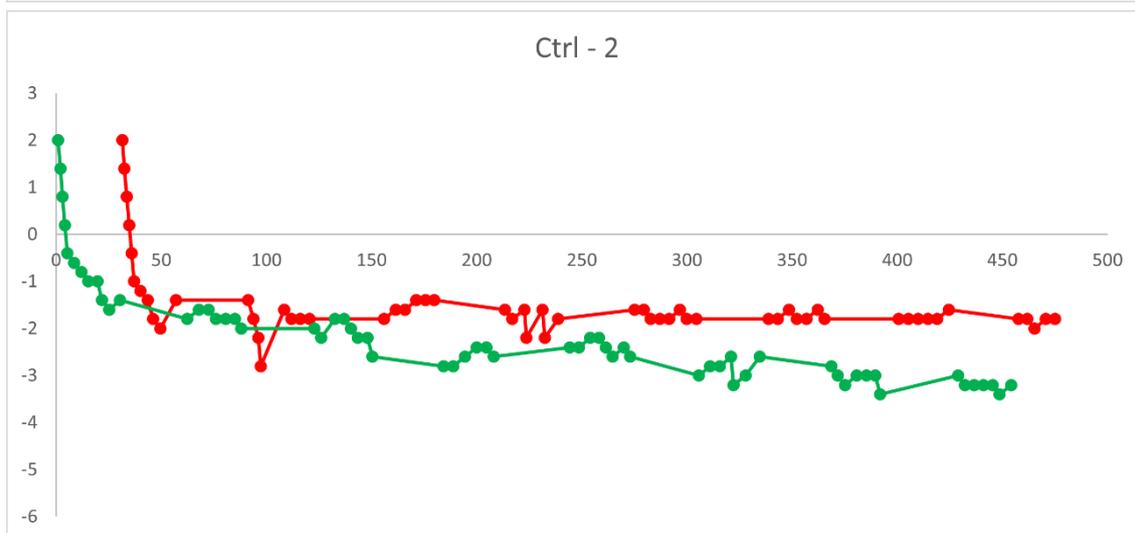
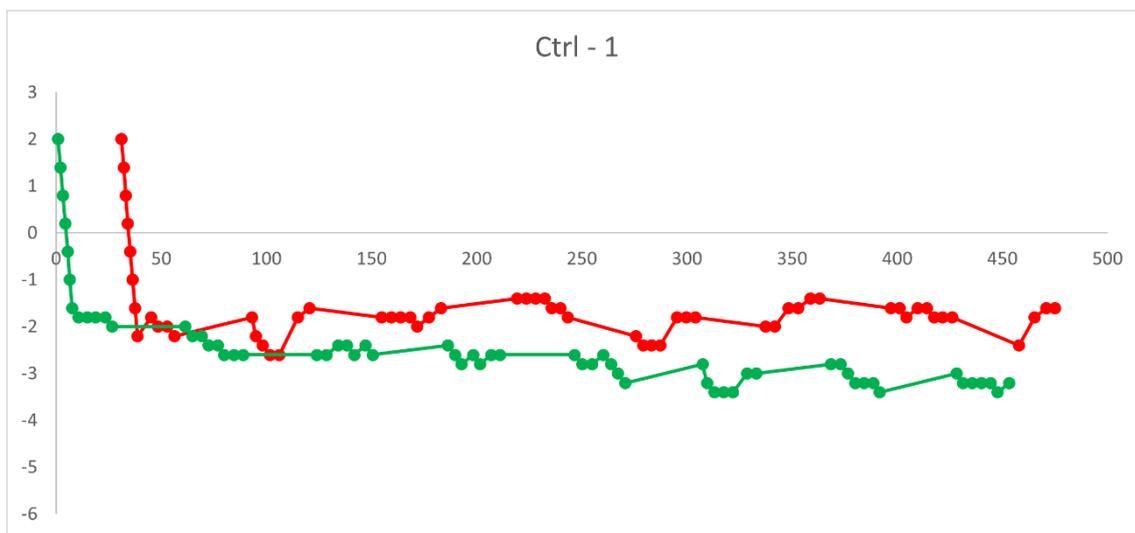


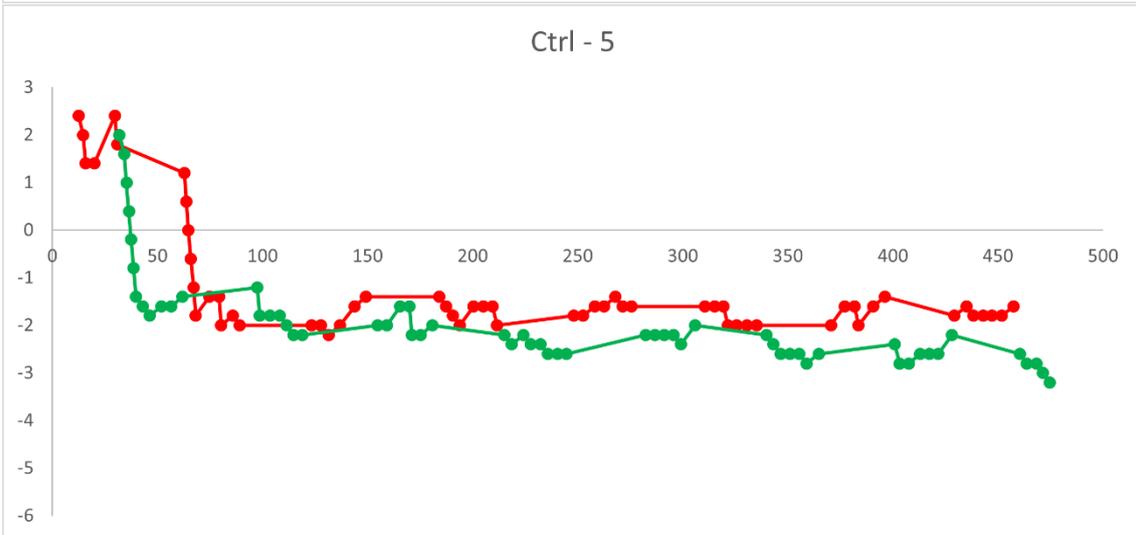
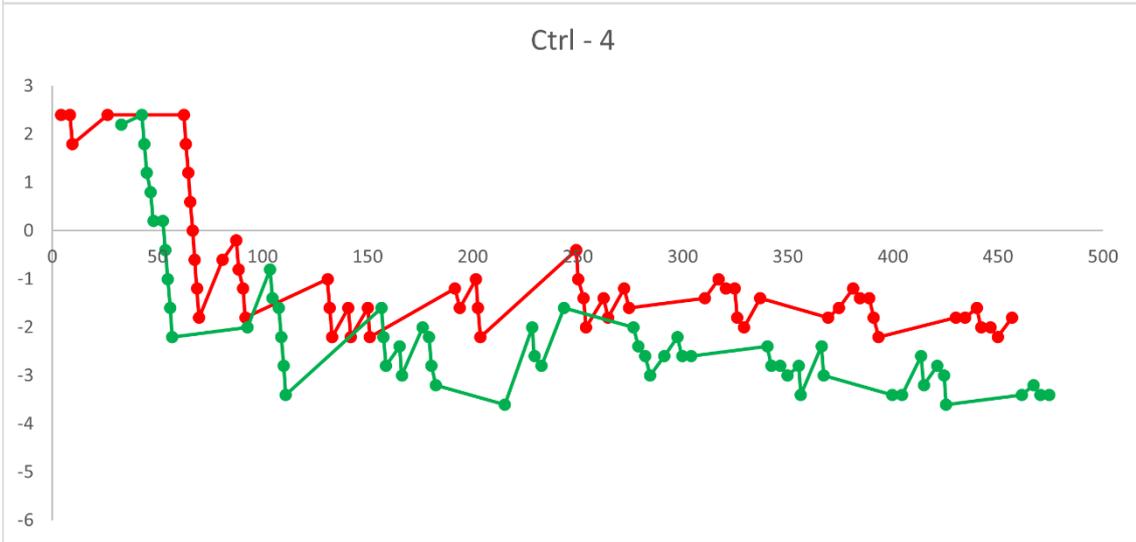
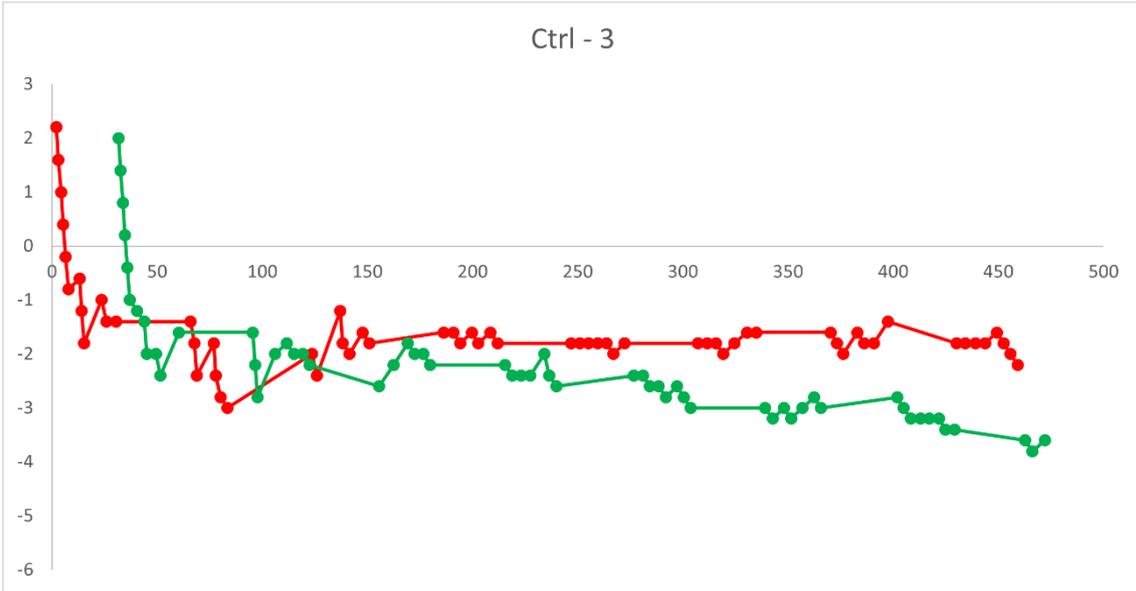


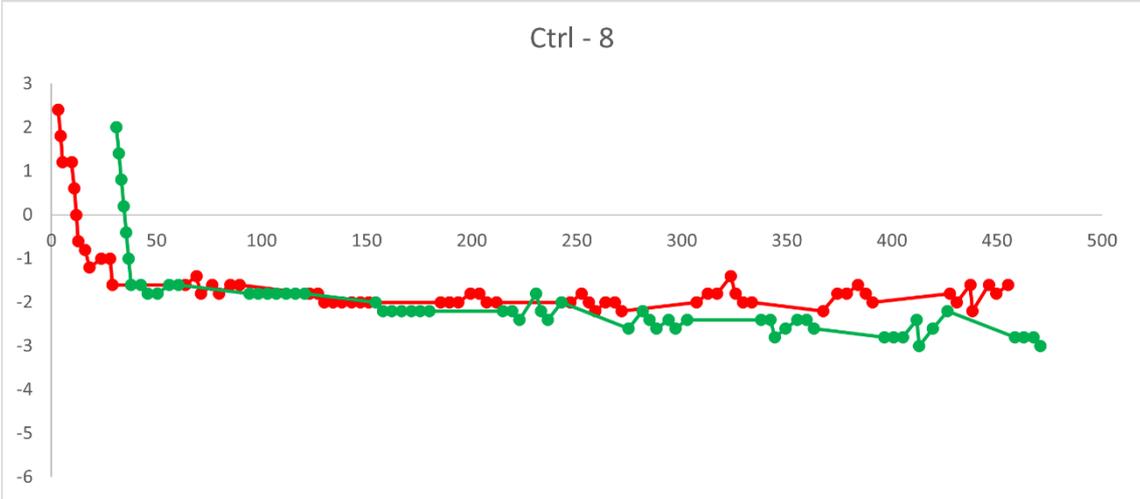
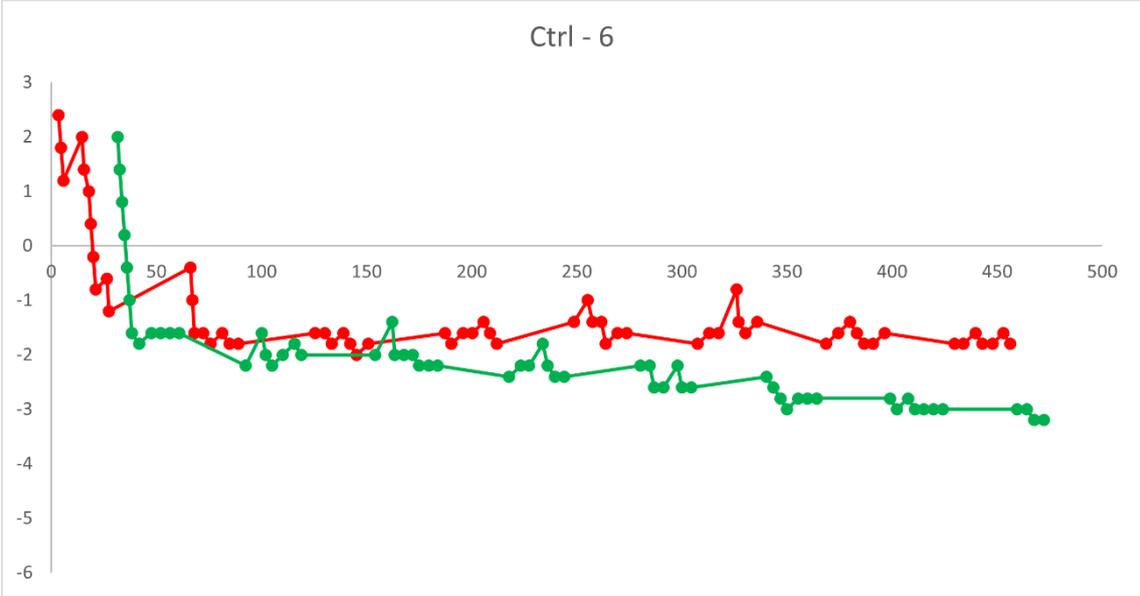


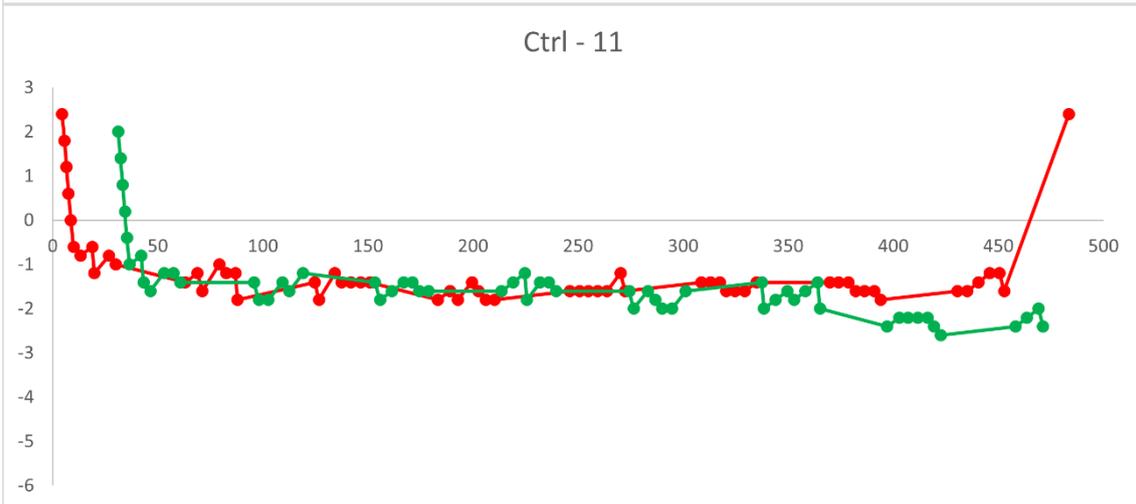
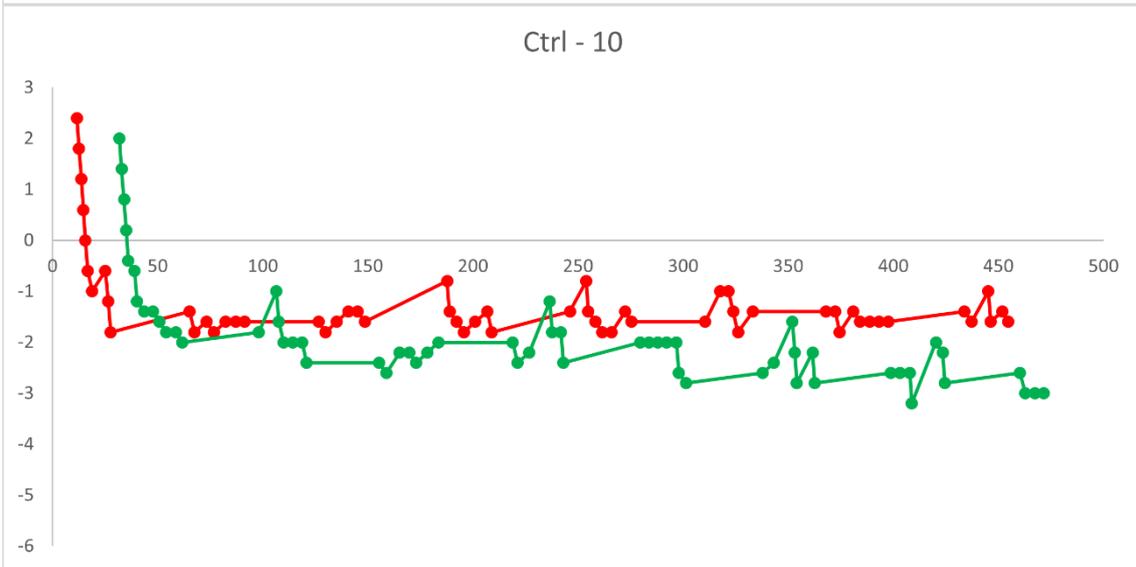
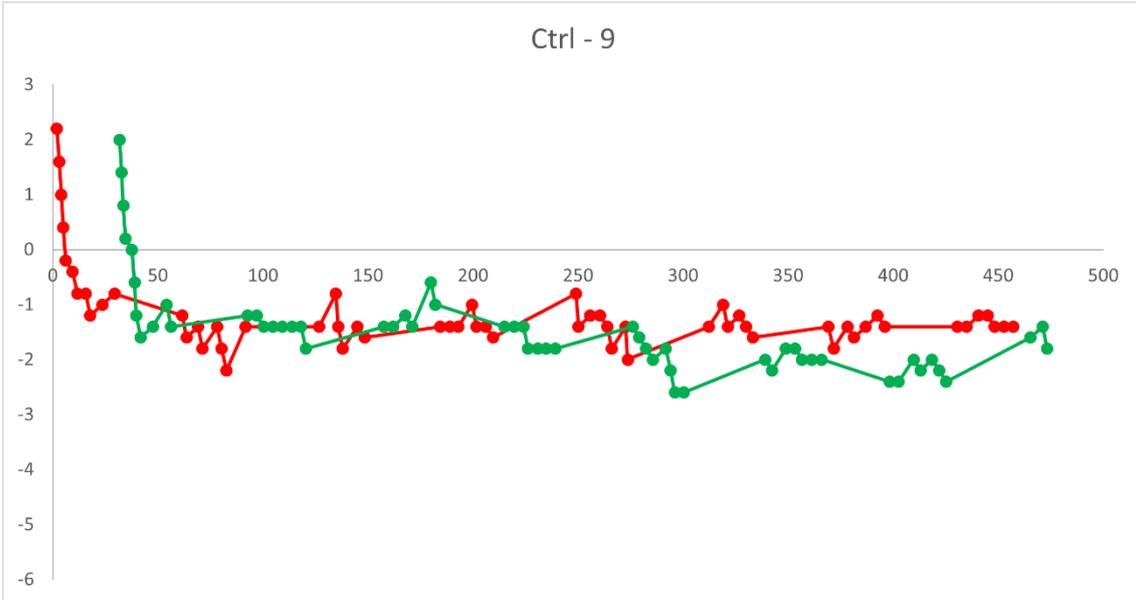
ANEXO III

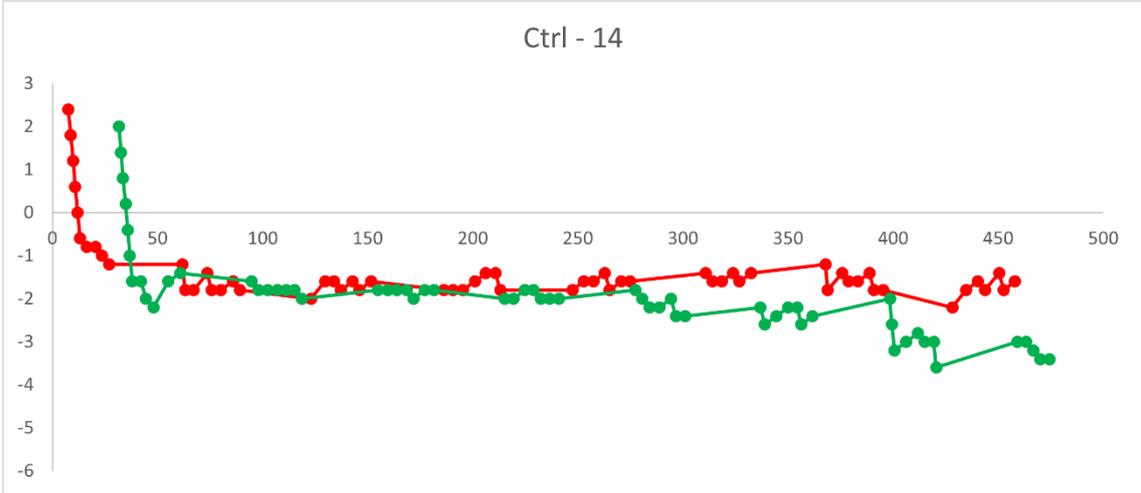
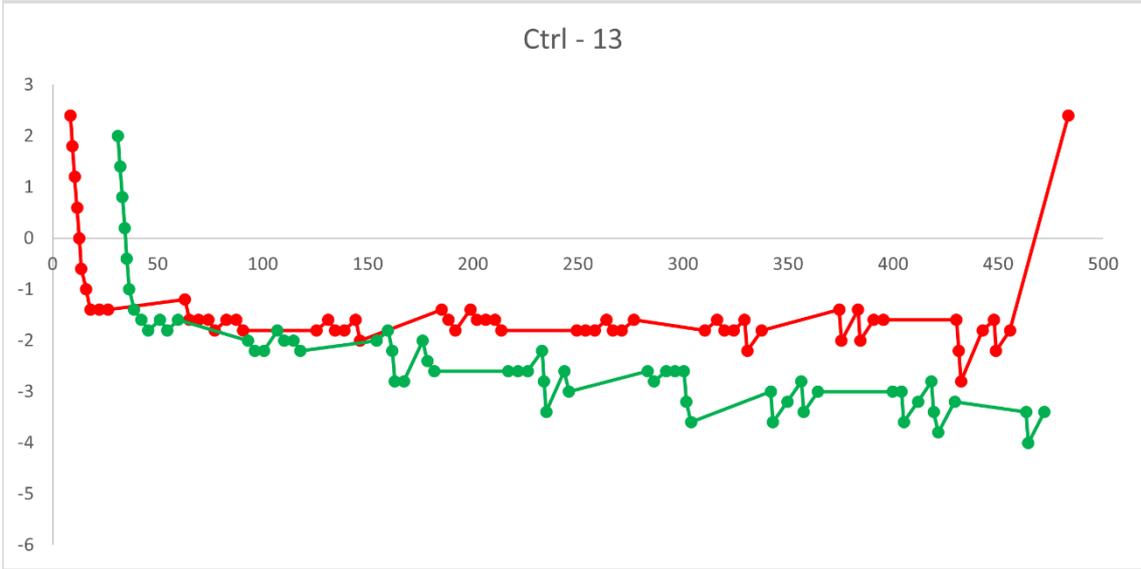
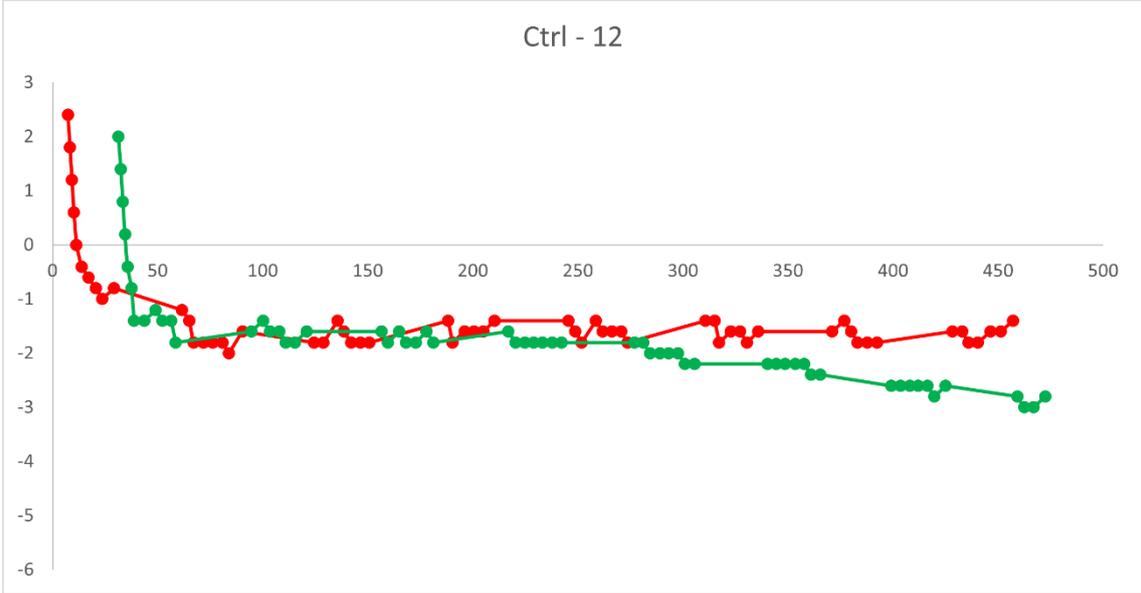
Gráficos Individuais do protocolo total dos cones - 8 min

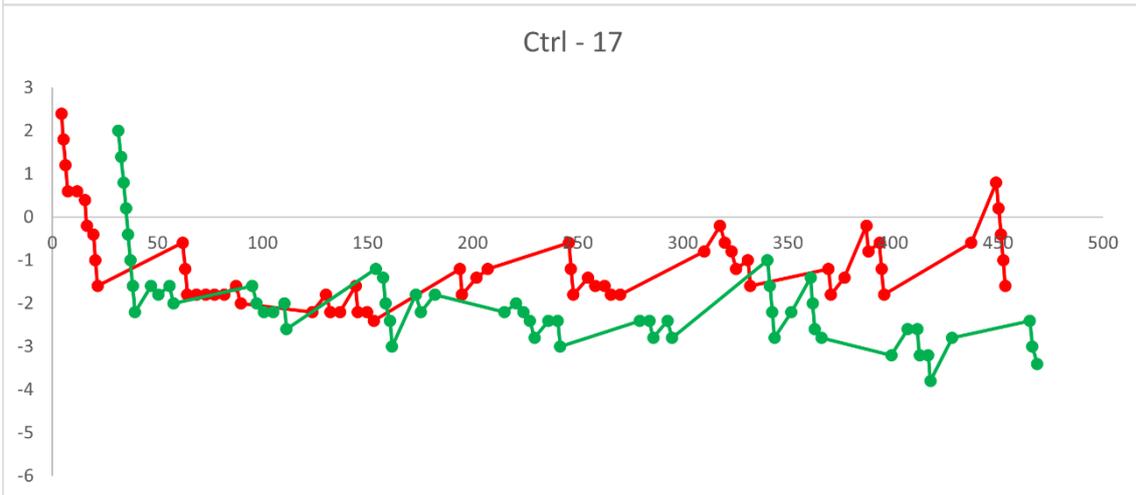
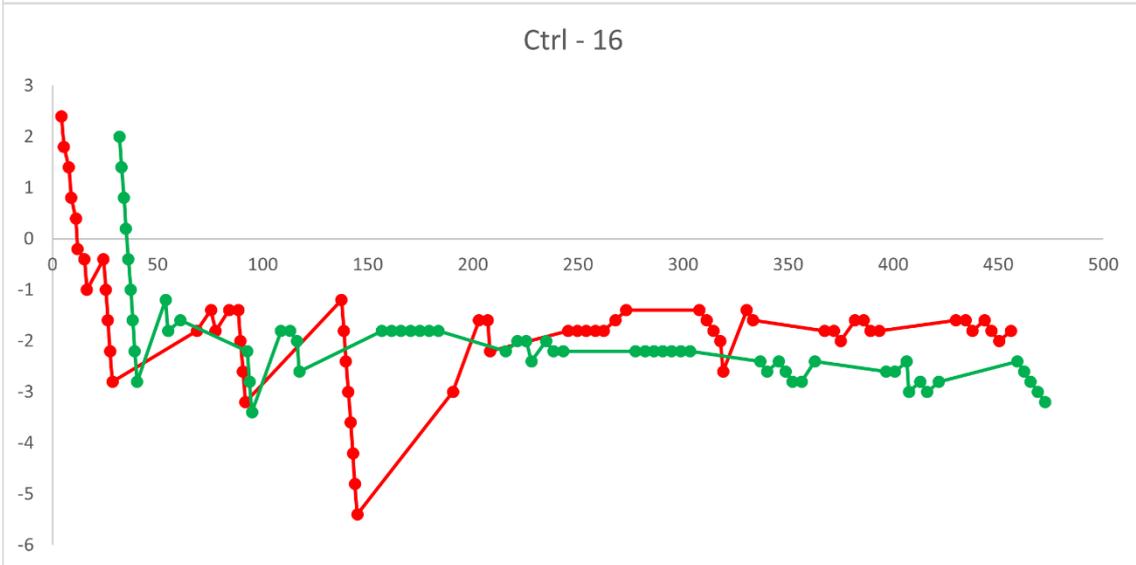
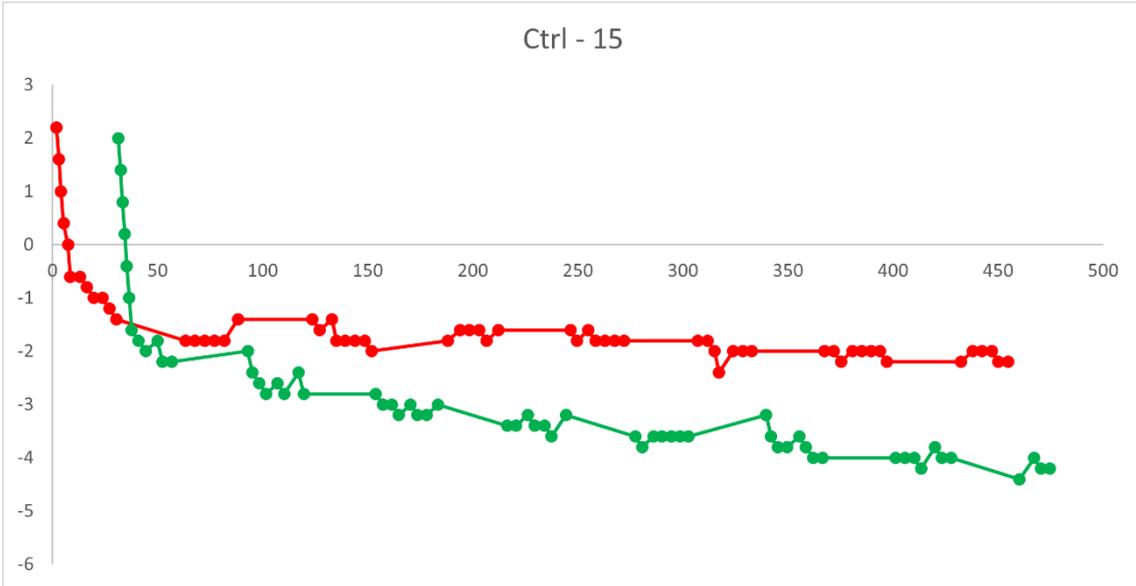
eixo Y = $\log \text{cd/m}^2$ e eixo X = tempo em seg

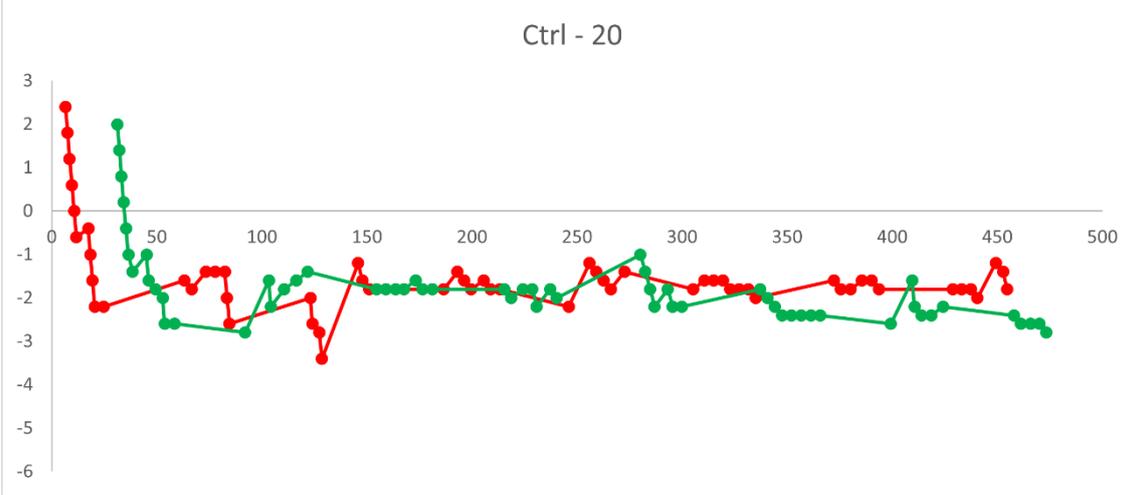
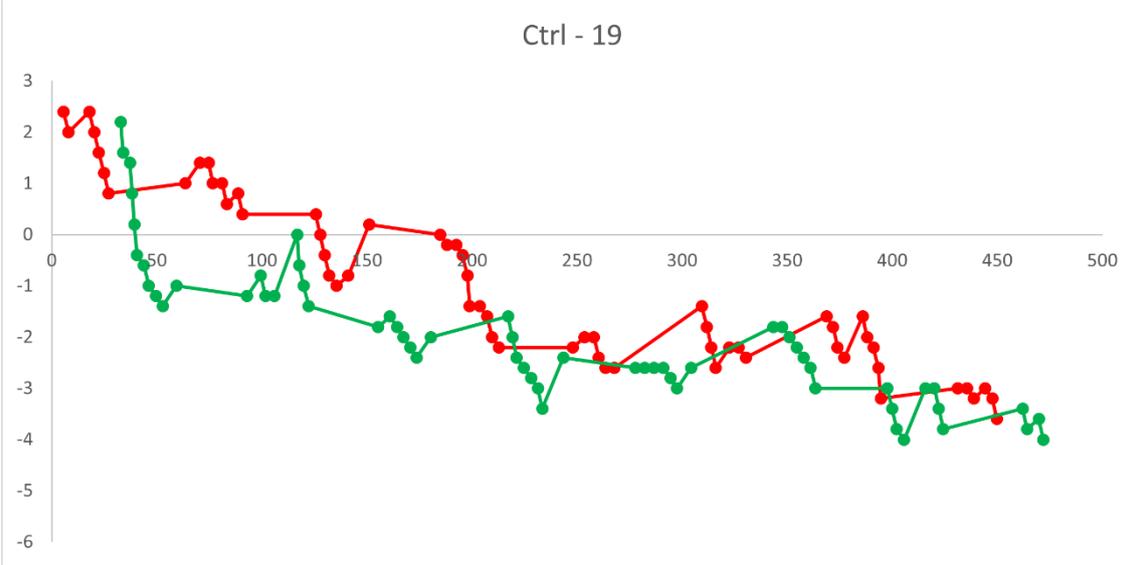
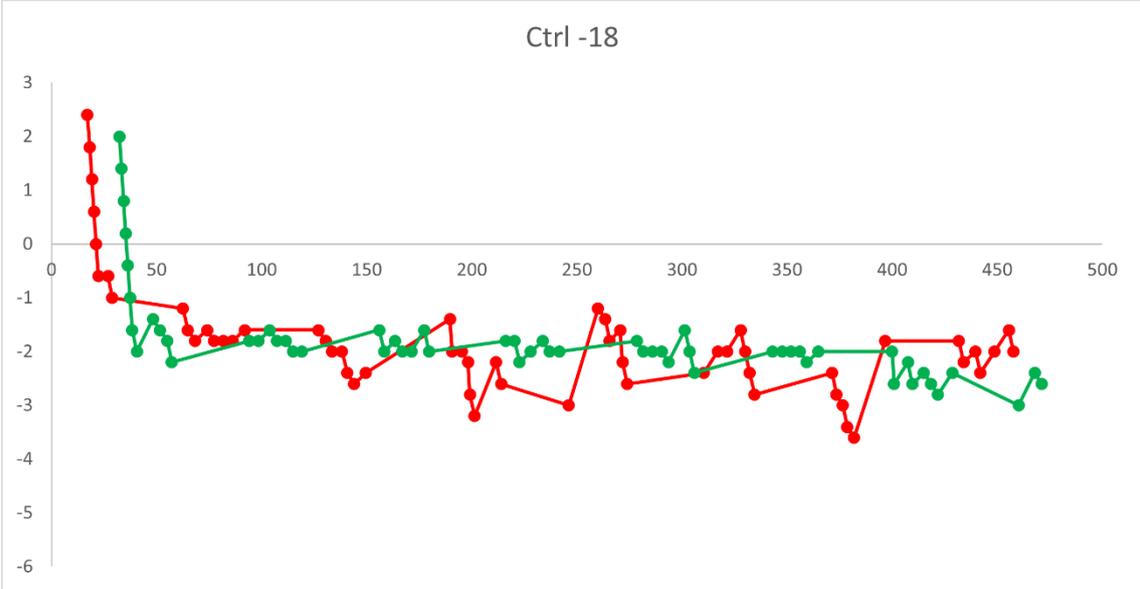


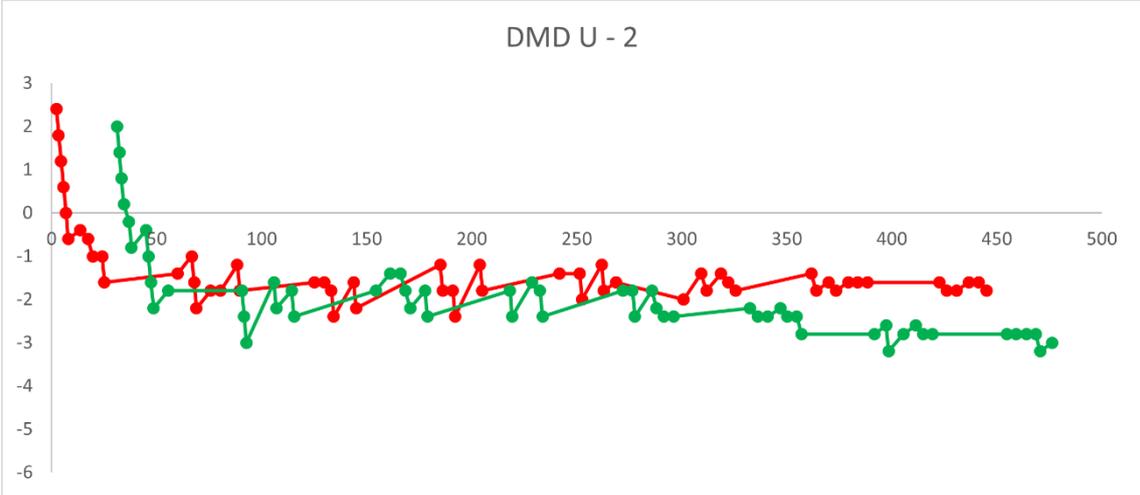
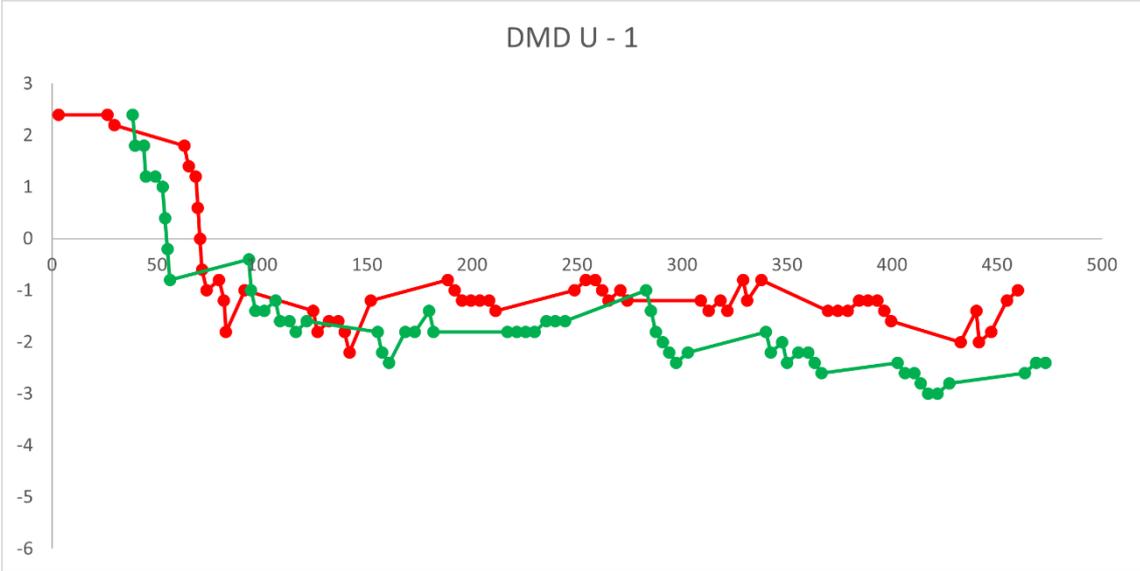
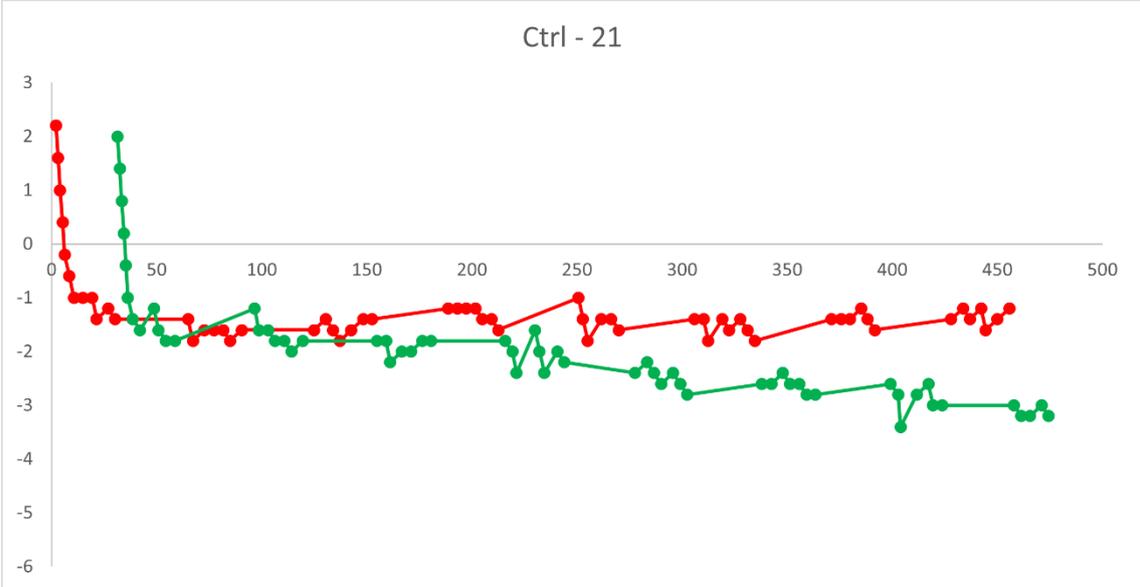


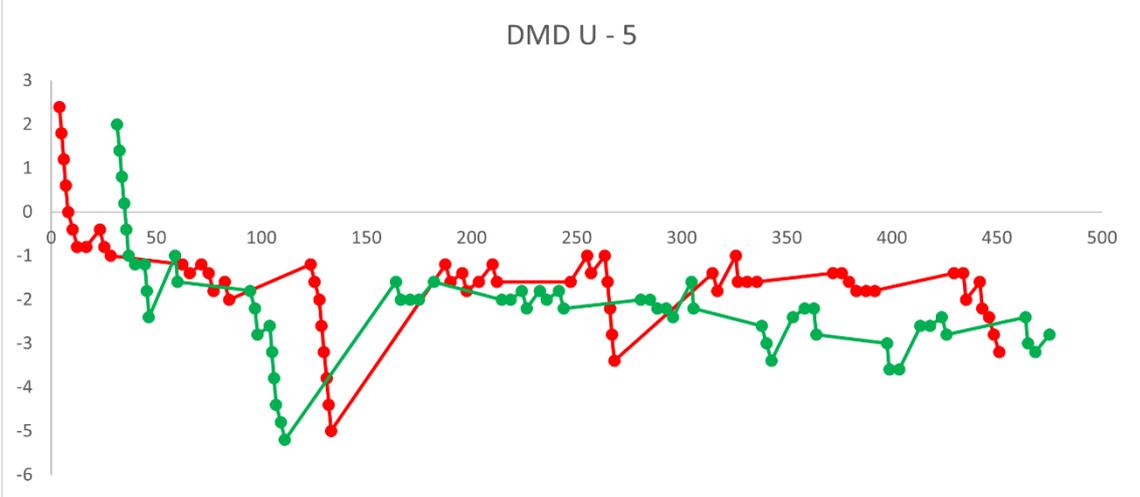
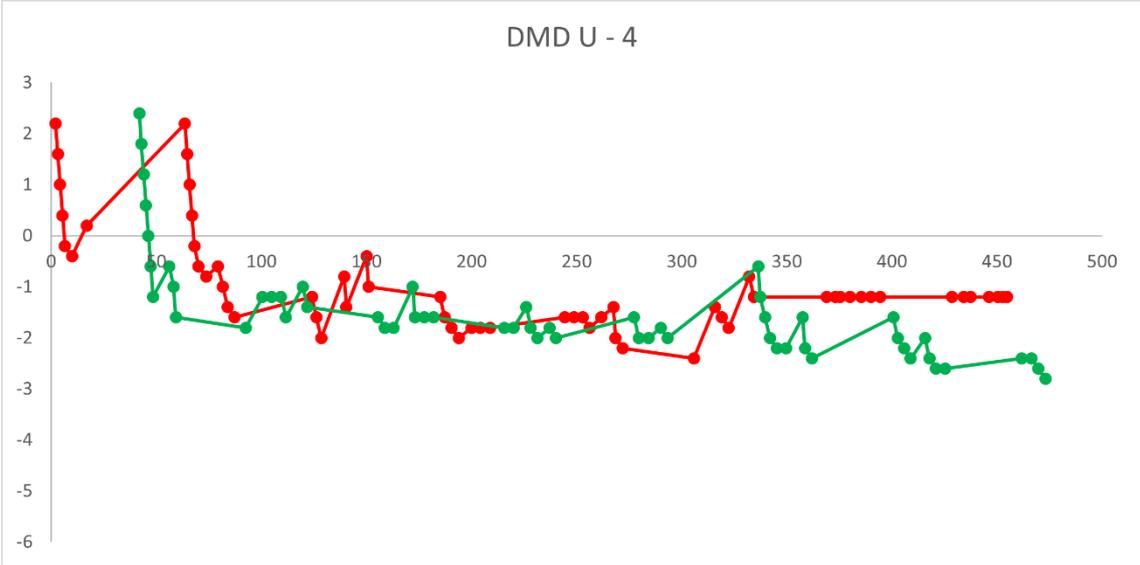
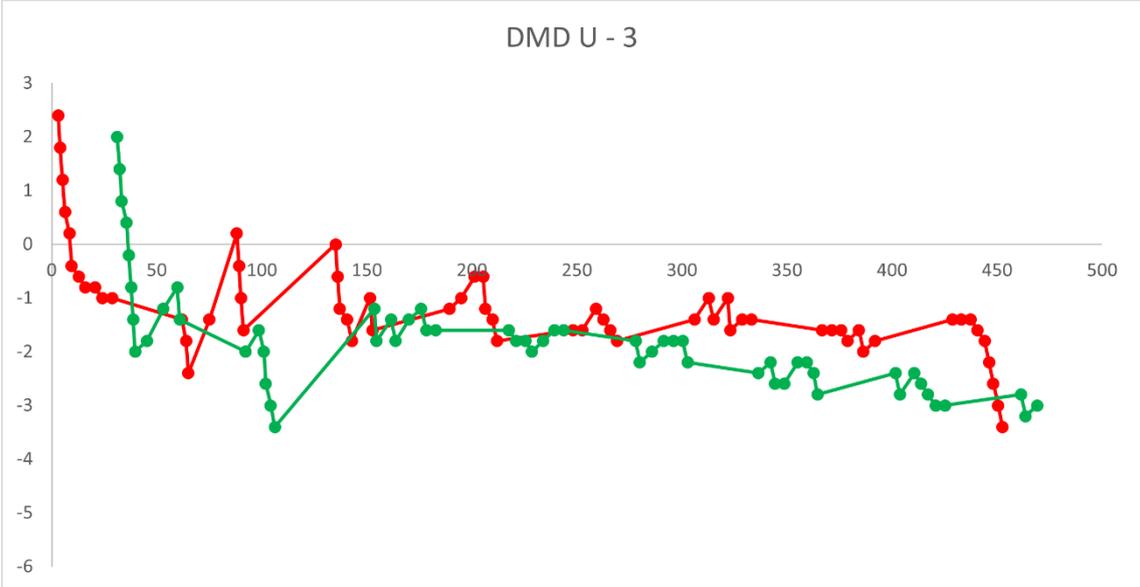


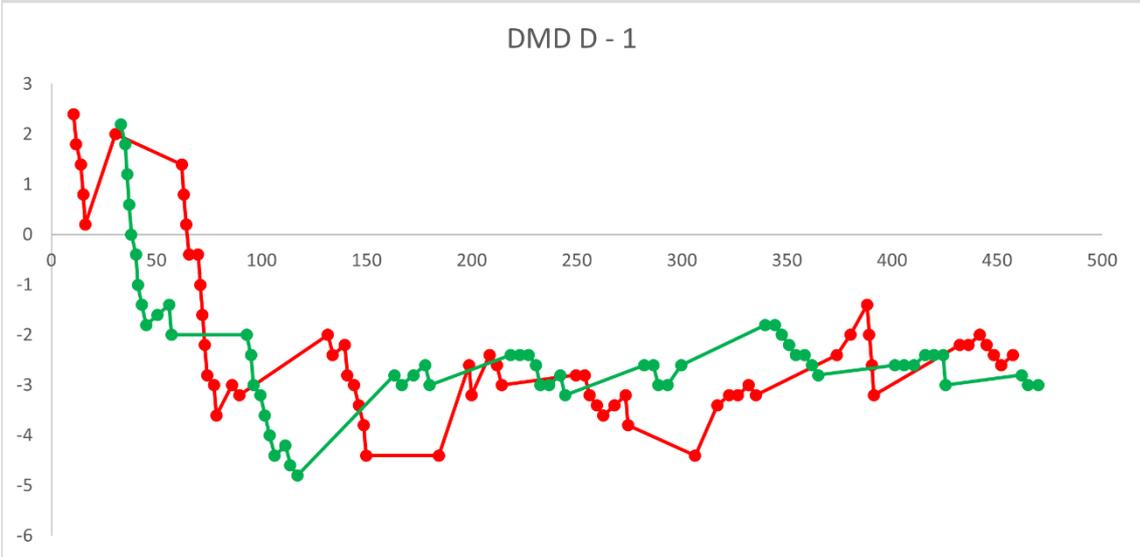
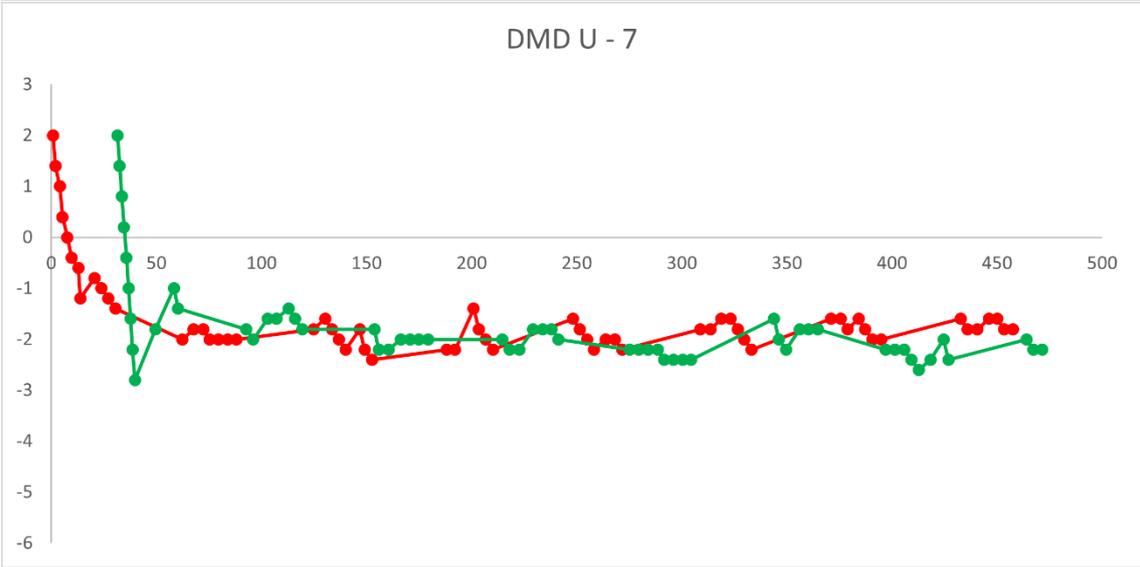
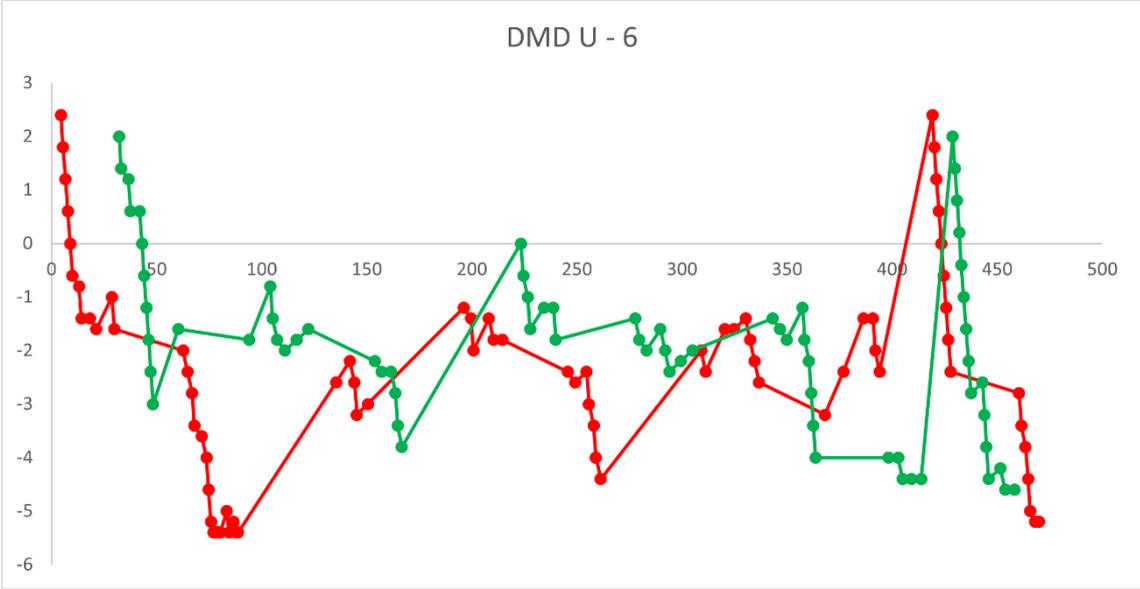


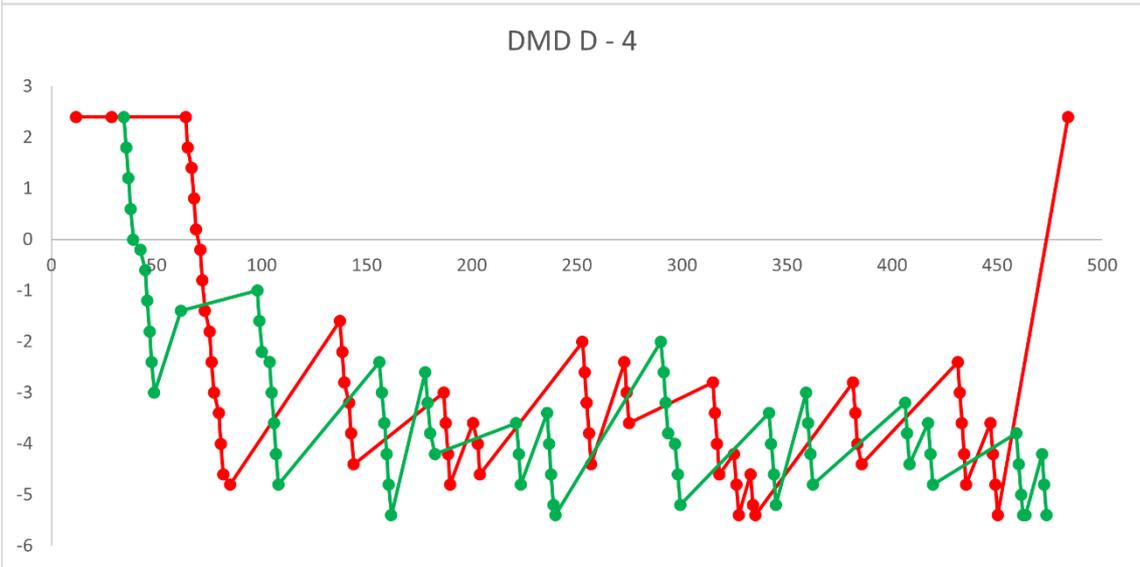
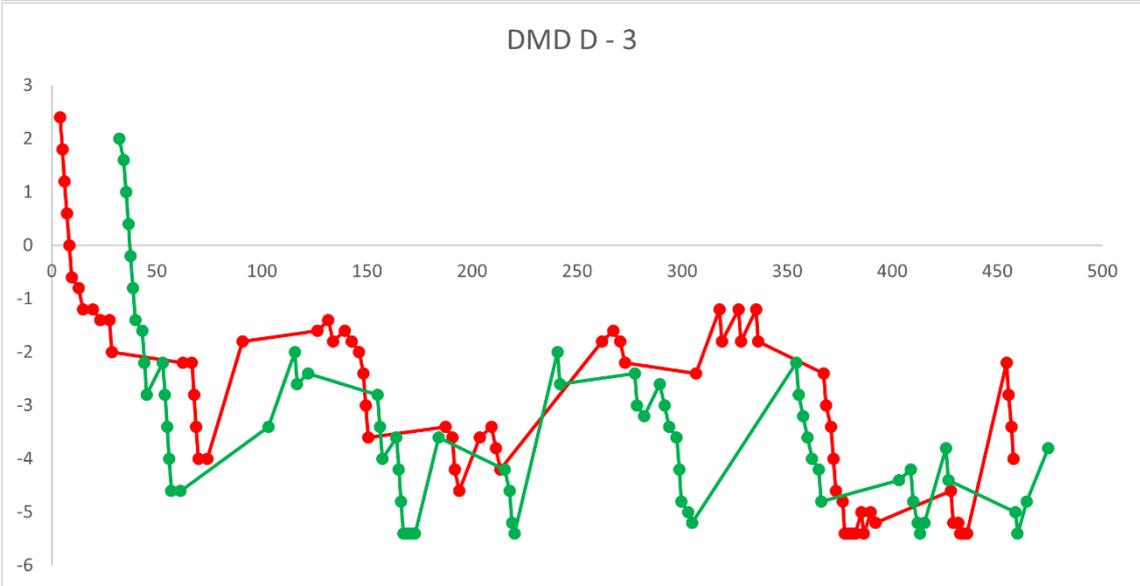
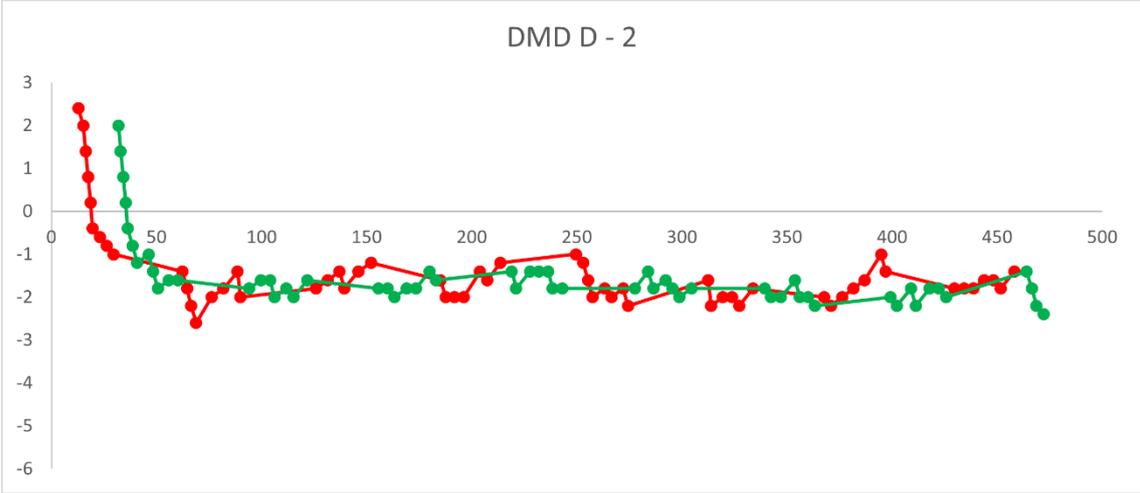


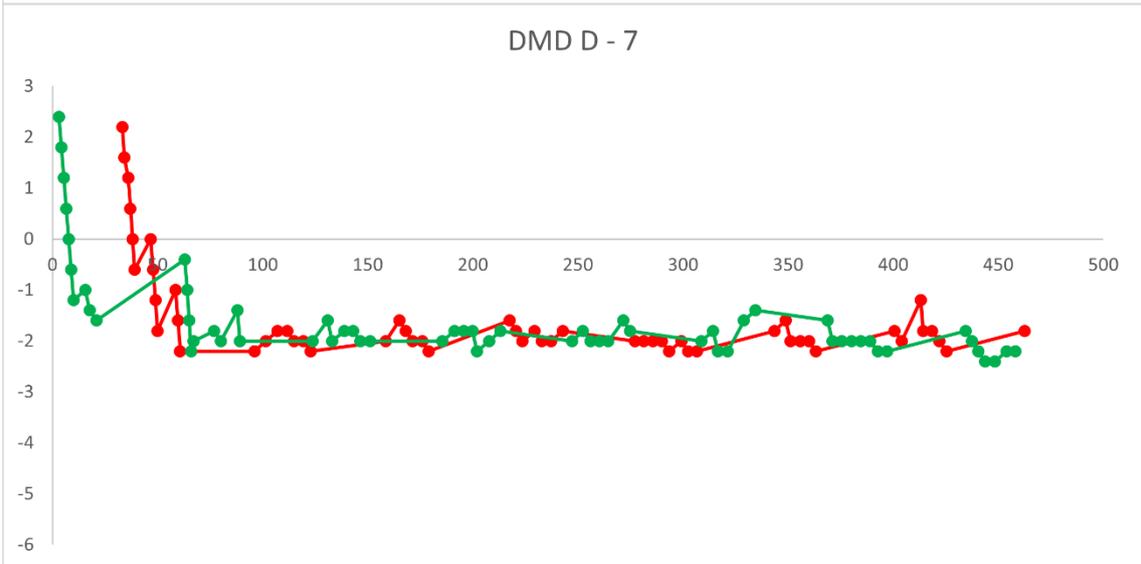
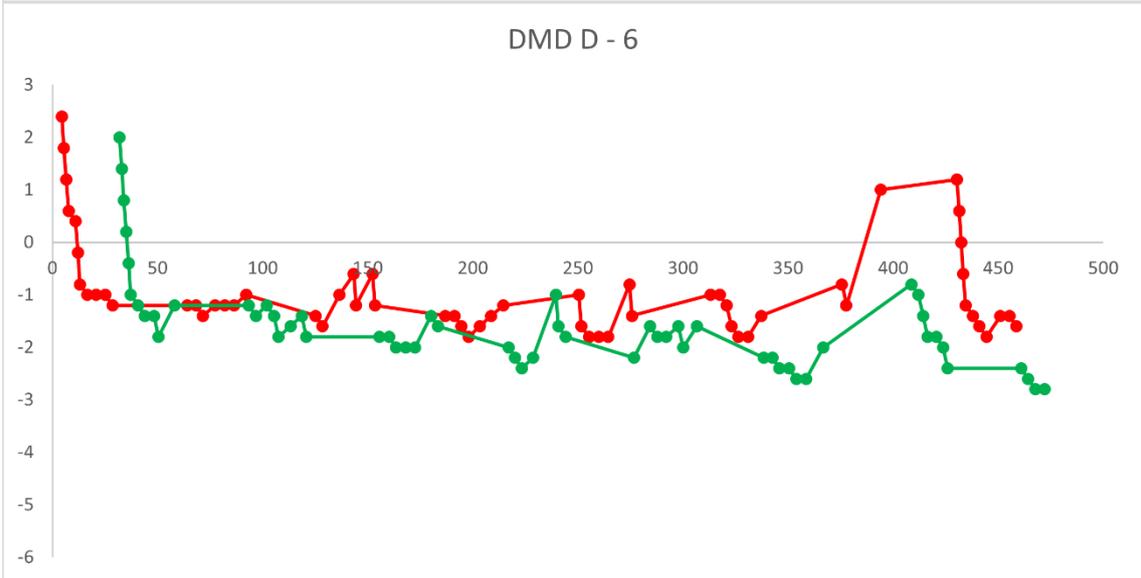
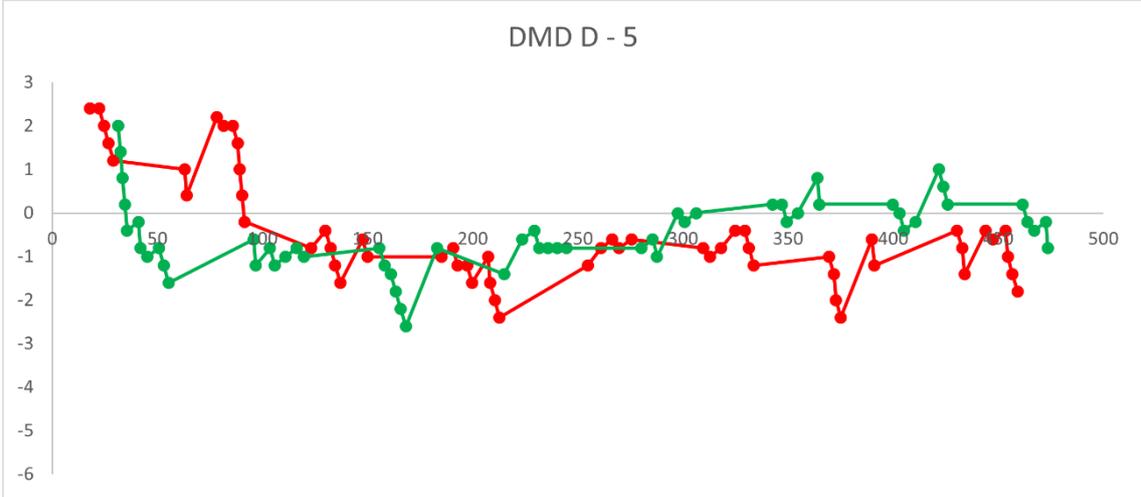


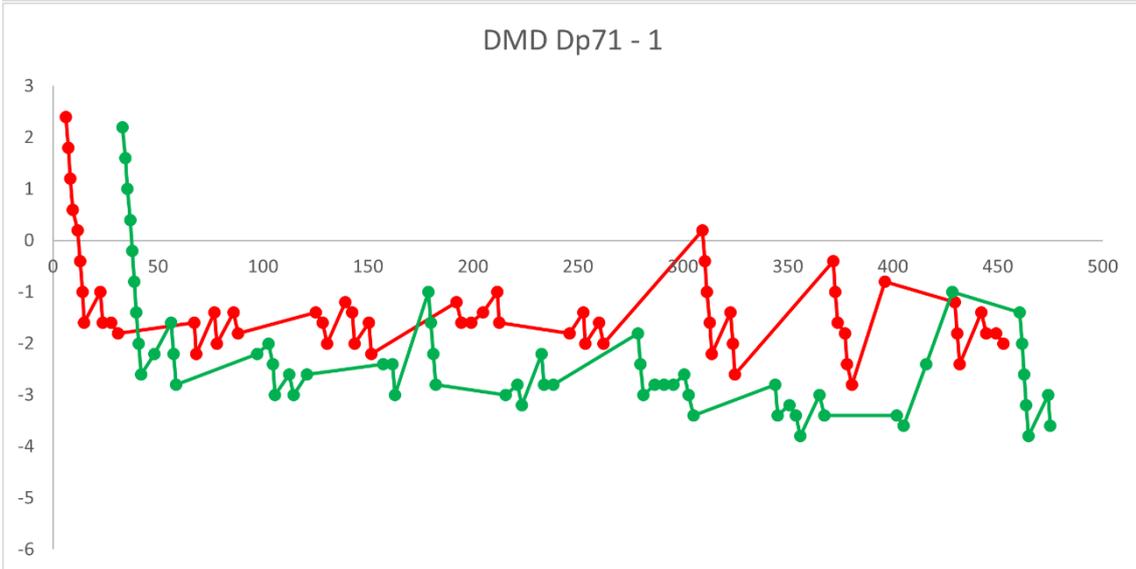
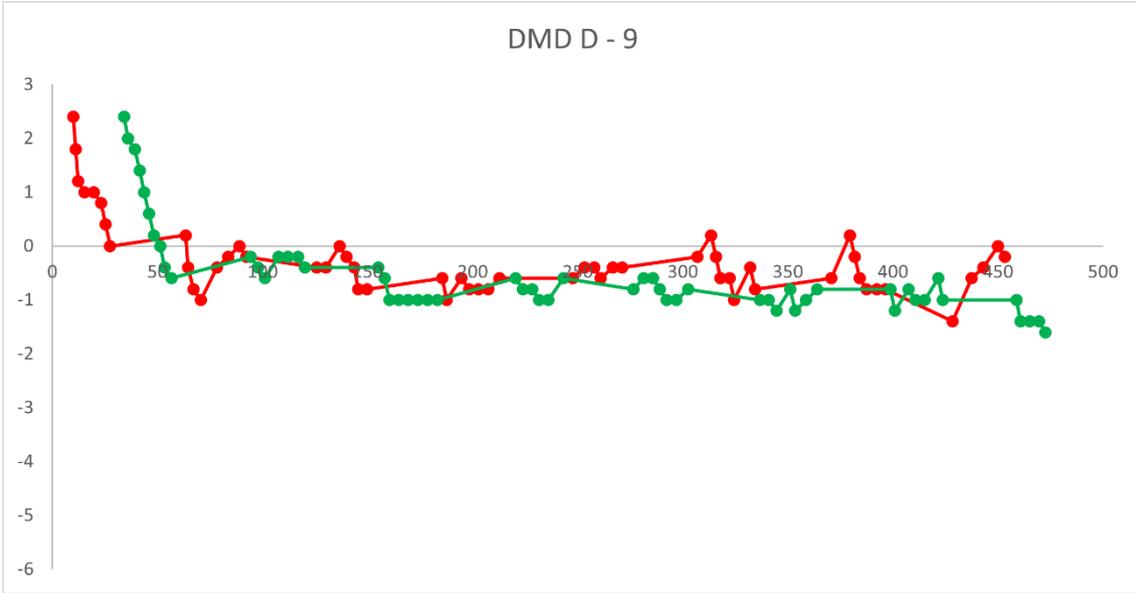
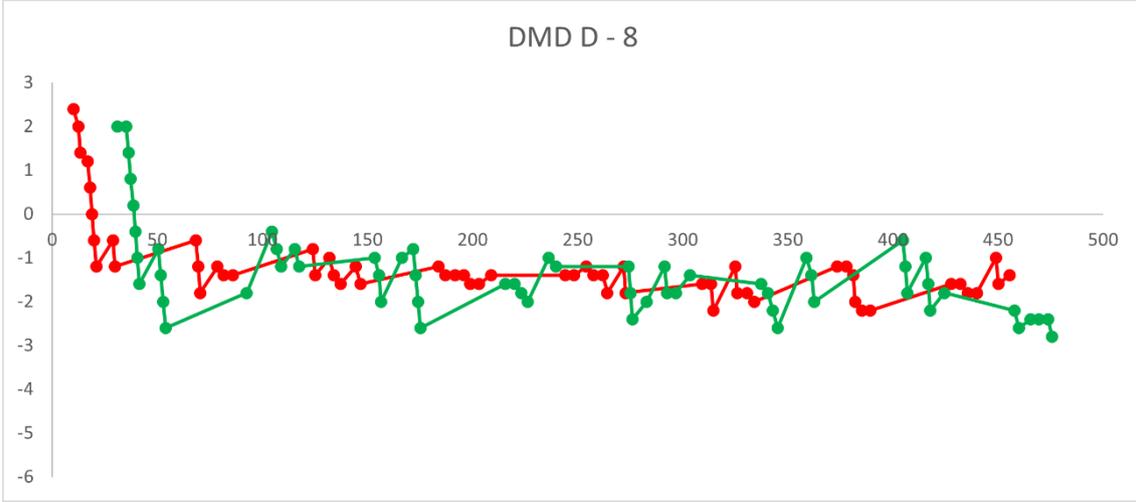


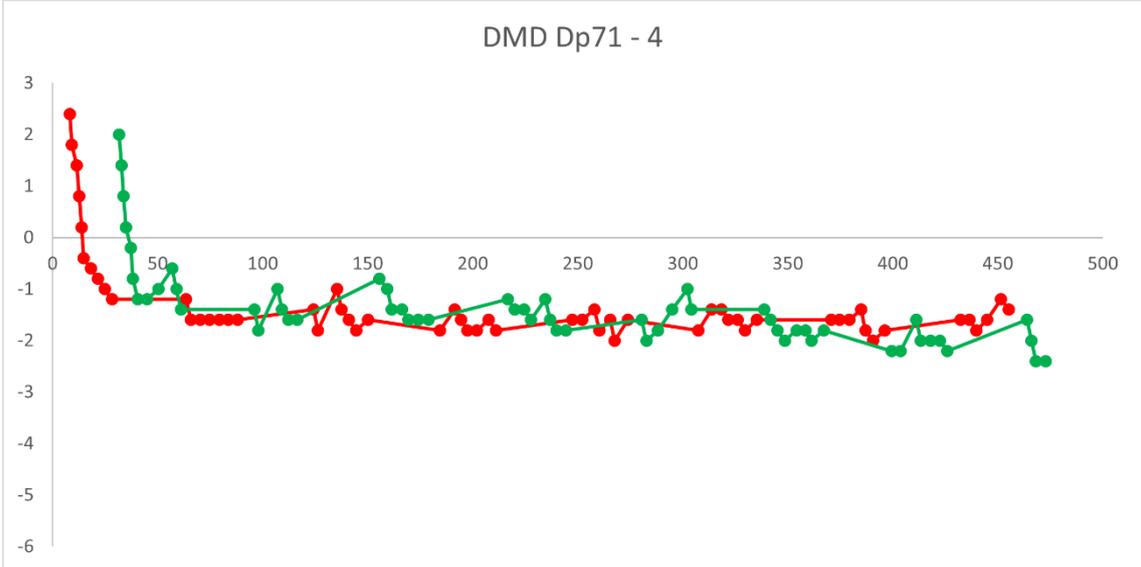
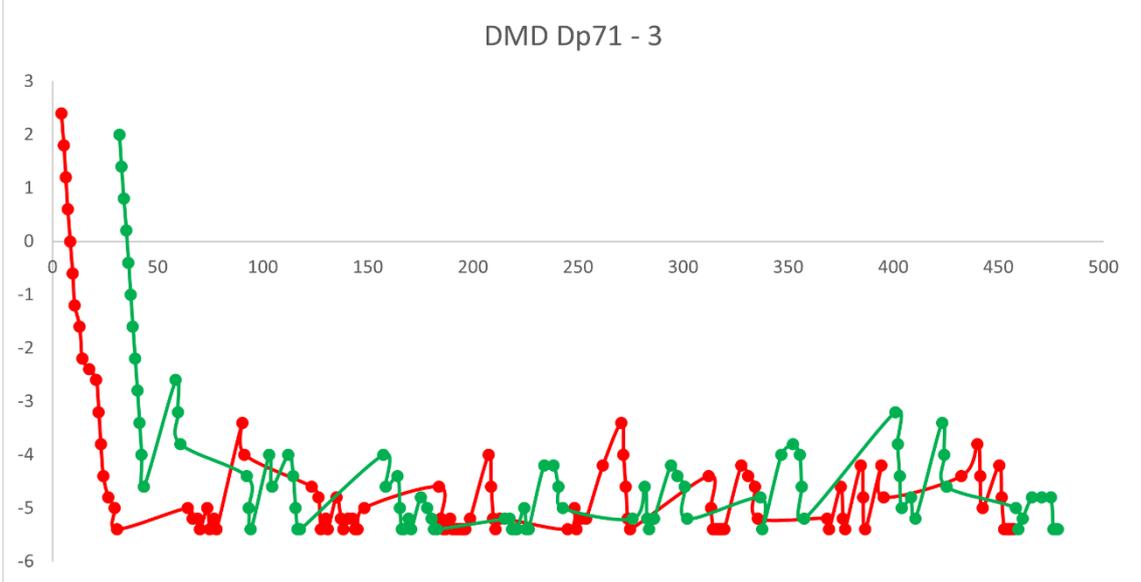
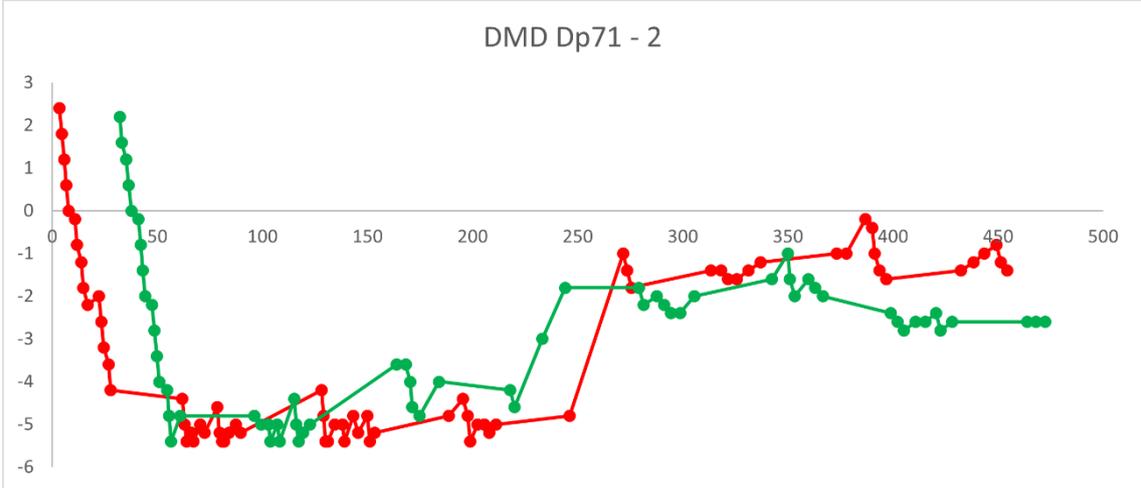












ANEXO IV

Dados Totais

I D	Grupo	AV	Idad e	Média	DesvPad	N	Média	DesvPad	N
				Bastonet e	bastonet e	tentativa bast.	Cone	cones	Tentativ a Cone
1	CTRL	20/20	19	-3,70	0,14	42,00	-1,83	0,29	6,00
2	CTRL	20/20	26	-4,53	0,13	42,00	-1,80	0,13	6,00
3	CTRL	20/20	21	-4,36	0,24	43,00	-1,85	0,18	8,00
4	CTRL	20/20	11	-4,16	0,44	42,00	-1,89	0,20	7,00
5	CTRL	20/20	17	-5,60	0,35	40,00	-1,74	0,10	7,00
6	CTRL	20/20	16	-4,31	0,17	42,00	-1,74	0,10	7,00
7	CTRL	20/20	13	-4,04	0,28	42,00	-1,73	0,37	8,00
8	CTRL	20/20	23	-4,03	0,22	42,00	-1,80	0,23	7,00
9	CTRL	20/20	9	-4,00	0,25	42,00	-1,34	0,10	7,00
10	CTRL	20/20	14	-3,98	0,22	41,00	-1,43	0,23	6,00
11	CTRL	20/20	17	-4,26	0,24	42,00	-0,89	1,46	7,00
12	CTRL	20/20	24	-4,50	0,14	42,00	-1,63	0,14	7,00
13	CTRL	20/20	12	-4,46	0,38	44,00	-1,45	1,61	8,00
14	CTRL	20/20	23	-4,46	0,19	42,00	-1,74	0,25	7,00
15	CTRL	20/20	21	-4,66	0,13	41,00	-2,10	0,11	6,00
16	CTRL	20/20	8	-4,23	0,13	41,00	-1,74	0,15	7,00
17	CTRL	20/20	8	-4,35	0,58	44,00	-0,43	0,85	6,00
18	CTRL	20/20	10	-3,95	0,40	42,00	-2,00	0,26	7,00
19	CTRL	20/20	7	-4,23	0,13	41,00	-3,17	0,23	6,00
20	CTRL	20/20	16	-4,11	0,29	41,00	-1,69	0,28	7,00
21	CTRL	20/20	22	-4,32	0,20	42,00	-1,34	0,15	7,00
22	DMD U	20/20	22	-3,12	0,46	40,00	-1,57	0,43	6,00
23	DMD U	20/20	19	-4,01	0,25	14,00	-2,09	0,76	9,00
24	DMD U	20/20	20	-4,25	0,46	45,00	-1,20	0,00	7,00
25	DMD U	20/20	8	-4,30	0,50	44,00	-2,13	0,66	8,00
26	DMD U	20/20	9	-4,00	0,35	41,00	-2,15	2,38	15,00
27	DMD U	20/20	7	-4,26	0,64	47,00	-1,71	0,11	7,00
28	DMD U	20/20	13	-2,93	0,60	41,00	-1,70	0,11	6,00
29	DMD D	20/20	14	-3,34	0,57	40,00	-2,29	0,20	7,00
30	DMD D	20/20	12	-3,43	0,28	42,00	-1,69	0,16	7,00
31	DMD D	20/20	14	-4,69	0,47	51,00	-4,45	1,18	11,00
32	DMD D	20/20	13	-4,58	0,35	48,00	-3,36	2,21	10,00
33	DMD D	20/20	9	-1,25	0,53	40,00	-0,91	0,52	9,00
34	DMD D	20/20	19	-3,74	0,27	41,00	-0,83	1,01	11,00
35	DMD D	20/20	16	-2,62	0,62	42,00	-2,00	0,20	3,00
36	DMD D	20/20	10	-2,92	0,33	41,00	-1,54	0,28	7,00
37	DMD D	20/20	16	-1,98	0,31	37,00	-0,52	0,54	5,00
38	DMD Dp71	20/20	12	-4,14	0,32	40,00	-1,77	0,39	7,00
39	DMD Dp71	20/20	18	-3,79	0,33	40,00	-1,17	0,23	6,00
40	DMD Dp71	20/20	9	-4,00	0,35	41,00	-4,87	0,59	11,00
41	DMD Dp71	20/20	17	-4,10	0,18	42,00	-1,53	0,21	6,00

