

Marcelo Fernandes da Costa

Perdas de Função Visual na Distrofia Muscular de
Duchenne: visão de cores e visão de contrastes de
luminância temporal e espacial

Tese apresentada ao Instituto de Psicologia da
Universidade de São Paulo como parte dos
requisitos para a obtenção do título de Doutor
em Psicologia.

Área de Concentração: Neurociências e Comportamento

Orientadora: Profa. Dra. Dora Selma Fix Ventura

Agosto 2004

I. Introdução:

O termo "Distrofia Muscular" inclui várias doenças geneticamente distintas, que reúnem um conjunto de características clínicas e patológicas variando em intensidade, padrão de herança genética e alteração molecular (O'Brien & Kunkel, 2001).

A forma mais comum de distrofia muscular é a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) causada por uma alteração na proteína distrofina, a qual afeta 1 para cada 3.500 nascidos vivos do sexo masculino (Matsuo, 1996; Nobile, Marchi, Nigro, Roberts, & Danieli, 1997; O'Brien *et al.*, 2001). O médico francês Dr. Guillaume Benjamin Amand Duchenne (1806-1875 - figura 1), desde sua graduação universitária se interessou pelas relações entre estimulação elétrica e músculos e foi ele quem descreveu a doença no contexto de estimulação elétrica dos músculos em 1861. Este seu interesse o levou a visitar vários hospitais, atendendo, realizando experimentos e tratando sujeitos com doenças musculares. Ao longo de sua jornada por diversos hospitais, ele encontrou e registrou detalhes em muitos garotos que tinham a condição que ele nomeou como Distrofia Muscular de Duchenne (<http://www.ikm.jmu.edu>). Embora descrições clínicas tenham sido publicadas previamente por Little e Merlyon, esta forma de distrofia recebeu o nome de Duchenne.

A maioria dos casos de DMD é transmitida através da mãe portadora não afetada (heterozigota). No entanto, aproximadamente 30% dos casos não têm história familiar prévia e são considerados como sendo uma nova mutação na linha germinativa da mãe ou dos familiares maternos (Matsuo, 1996).

O gene da distrofina é o maior dos genes conhecidos nos mamíferos. No homem, é composto de 79 exons distribuídos sobre, aproximadamente, 2500 kilobases (kb) de DNA



Figura 1: Foto do Dr. Guillaume Benjamin Amand Duchenne (1806-1875). Foto retirada do site: www.physiopaed.de/duchenne.htm

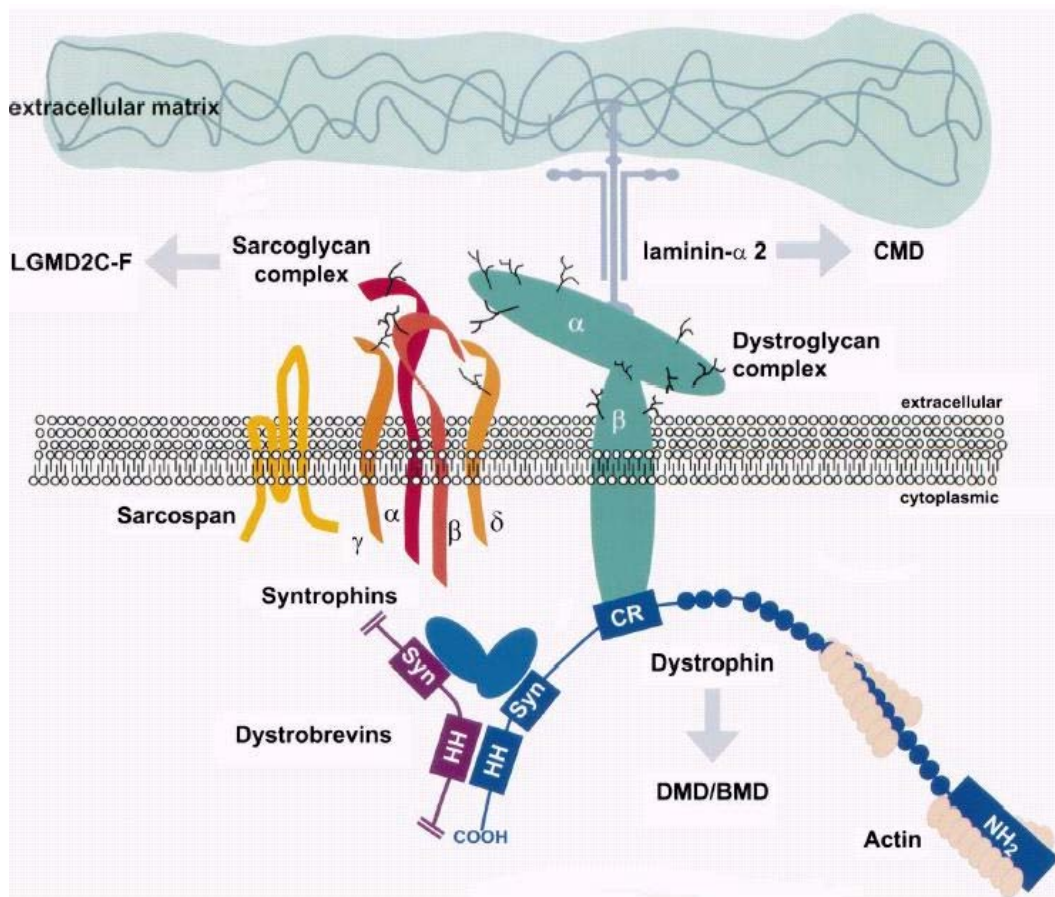


Figura 2: Ilustração mostrando a localização citoplasmática da distrofina. Pode-se observar as interações que os 4 territórios realizam com outras proteínas citoplasmáticas (O'Brian et al., 2001).

(Nobile *et al.*, 1997). Localiza-se na região 21 do braço curto do cromossomo "X" (Xp21). Apresenta uma extensa região codificadora, cujos aminoácidos foram totalmente seqüenciados em 1988 (Koenig, Mônico & Kunkel, 1988).

Os sujeitos afetados por DMD são, na sua grande maioria, meninos entre 3-5 anos de idade que apresentam como os primeiros sintomas dificuldade para subir escadas e passar da posição de sentado para de pé. A perda muscular que ocorre é rápida e grave levando a maioria das crianças, a fazerem uso de cadeiras de rodas por volta dos 13 anos de idade. Muitos morrem até o final de sua 2ª década de vida por falência músculo-cardíaca e respiratória (Hauser & Chamberlain, 1996; O'Brien *et al.*, 2001).

Em 1957, Peter Emil Becker propôs a existência de uma forma mais discreta de distrofia muscular ligada ao cromossomo X, com surgimento posterior dos sintomas e progressão mais lenta (O'Brien *et al.*, 2001). Nessa variante, a necessidade de tecnologia de suporte como cadeiras de rodas e muletas ocorre mais tarde e o tempo de vida é mais longo (Matsuo, 1996). Esta variante alélica da DMD é atualmente conhecida como Distrofia Muscular de Becker (DMB) e afeta 1 em cada 35.000 nascidos vivos do sexo masculino (Blake & Kroger, 2000).

I.1. Distrofia Muscular de Duchenne e Distrofina

A distrofina é uma proteína intracelular extremamente grande (427 kilodaltons - kDa) (Blake *et al.*, 2000; Cibis, Fitzgerald, Harris, Rothberg, & Rupani, 1993; Hauser *et al.*, 1996) (figura 2). Está associada a um complexo de proteínas que atravessam a membrana celular e ligam o citoesqueleto celular a componentes da matriz extracelular. Um das funções deste complexo é atuar na tradução intracelular de sinais moleculares provenientes do meio extracelular além de organizar complexos macromoleculares, para

uma tradução eficiente deste sinal para o núcleo celular (Mehler, 2000). Muitas destas proteínas têm sido implicadas em vários processos celulares incluindo a sinaptogênese, homeostase de Ca^{2+} , manutenção da estabilidade mecânica das células do músculo durante o stress gerado pela contração e pelo relaxamento, além de ser encontrada associada a canais iônicos de alguns neurônios pós-sinápticos no córtex cerebral (Blake *et al.*, 2000). A ausência da distrofina na DMD permite que as contrações levem à indução de danos, iniciando um processo de necrose e fibrose do tecido muscular (Hauser *et al.*, 1996).

O gene da distrofina exibe uma complexa regulação de transcrição da proteína com a presença de, pelo menos, oito promotores. A distrofina de tamanho total ou Dp427 (em inglês “*dystrophin protein*”) contém 3685 aminoácidos, 180 nanômetros de comprimento e é transcrita a partir de 3 promotores. O promotor M é ativado nos músculos esqueléticos, cardíacos células vasculares endoteliais e células gliais do SNC; promotor C é ativado no córtex cerebral, neurônios da região CA3 do hipocampo; promotor P dirige a síntese de distrofina nas células cerebelares de Purkinje e está presente no córtex cerebral fetal. As diferentes isoformas de Dp427 são, provavelmente, funcionalmente equivalentes, pois só são diferentes de poucos aminoácidos na região N-terminal (Blake *et al.*, 2000; Essex & Roper, 2001; Fortina *et al.*, 1997; Mehler, 2000).

Além dos promotores que levam a transcrição total do gene encontrada nos músculos e em várias regiões do córtex e células de Purkinje, existem também muitas transcrições intragênicas menores, iniciadas por outros promotores (figura 3), que são encontradas na retina (Dp260), neurohipófise, córtex olfativo, superfícies leptomeningiais e rim (Dp140), células de Schwan, diencéfalo neonatal e nervos periféricos (Dp116) e

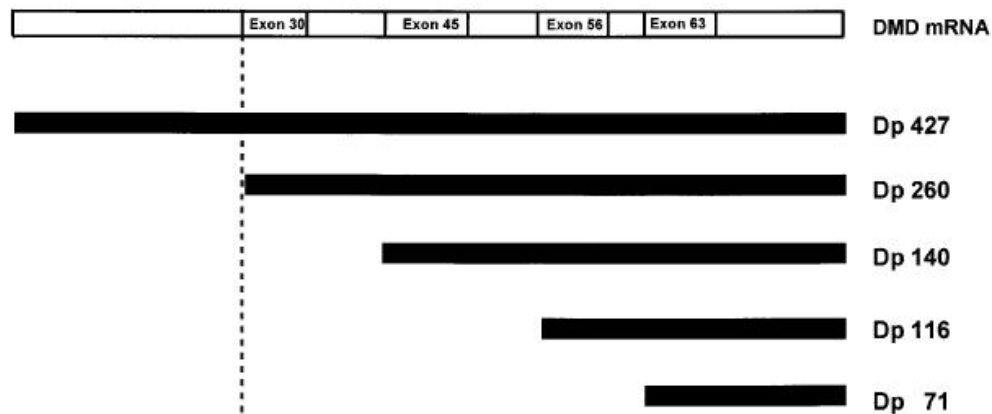


Figura 3: Ilustração mostrando os principais promotores encontrados no RNA mensageiro da distrofina. A linha pontilhada mostra o promotor interno localizado no exon 30, responsável pela transcrição da Dp260, a isoforma da distrofina relacionada com a fisiologia retiniana (Piller et al., 1999).

Tabela 1: Organização dos genes da distrofina: promotores do sistema nervoso

-
1. C: proteína de tamanho total em neurônios do cortex cerebral e região CA3
 2. M: proteína de tamanho total em células endoteliais vasculares e gliais do SNC
 3. P: proteína de tamanho total em células cerebelares de Purkinje e cortex cerebral fetal
 4. Dp260: transcrita a partir do exon 30; presente na camada plexiforme externa da retina
 5. Dp140: transcrita a partir do exon 45; presente em astrócitos, nervo olfatório, neurohipófise
 6. Dp116: transcrita a partir do exon 57; presente no diencéfalo neonatal e nervos periféricos
 7. Dp71: transcrita a partir do exon 64; presente nas células tronco embrionárias, córtex cerebral, retina, glândula pituitária, bulbo olfatório, giro dentado hipocampal, associado com vesículas sinápticas.
-

*Adaptada de Schmitz, 1997.

células tronco embrionárias, mesencéfalo perinatal, giro denteado hipocampal, pituitária, bulbo olfatório e retina (Dp71) (O'Brien *et al.*, 2001; Verbovaia & Razin, 1997) ilustrados na tabela 1.

Comparações da seqüência da proteína distrofina revelam muitas semelhanças com proteínas de outras famílias. Com base em sua seqüência de aminoácidos, a proteína total de 472 kDa tem sido tradicionalmente dividida em 4 domínios funcionais: 1. domínio N-terminal com múltiplos sítios ligados à actina com semelhanças aos membros das famílias de proteínas *crosslinking* (ligação cruzada); 2. repetição estrutural semelhante à espectrina com forma de bastão em tripla hélice que permite flexibilidade à proteína; 3. um domínio rico em cisteína, semelhante à α -actinina; 4. um único domínio C-terminal (Mehler, 2000).

O domínio N-terminal tem uma grande interação com F-actinas e funciona como dobradiças flexíveis. O domínio rico em cisteína parece ser essencial para a interação da distrofina com o complexo distroglicano transmembranar, enquanto o domínio C-terminal contém sítios de ligação para muitas proteínas intracelulares (Matsuo, 1996; Verbovaia *et al.*, 1997).

Biópsias realizadas em pacientes com DMD mostram um conjunto de mudanças patológicas, características de distrofia muscular: o aumento do tecido conjuntivo existente entre as fibras musculares, infiltrações de tecido adiposo, sinais de degeneração e regeneração das fibras musculares, variação do tamanho das fibras e a centralização do núcleo (O'Brien *et al.*, 2001).

Quanto às alterações genéticas observadas nos pacientes temos: deleções gênicas em aproximadamente 65%, duplicações em 5% e nos 30% restantes, pontos de mutações ou deleções/duplicações em pequena escala (Verbovaia *et al.*, 1997, Sitnik *et al.*, 1997) as

quais não podem ser detectadas pelas estratégias de procura utilizadas atualmente, dado o grande tamanho do gene.

Por convenção, deleções no gene que ocorrem posteriormente a um exon de referência são habitualmente chamadas de “deleções downstream”, enquanto que as deleções que ocorrem anteriormente a este mesmo exon são chamadas de “deleções upstream” (Alberts *et al.*, 1989; Hawkins, 1996).

As causa das diferenças clínicas e bioquímicas entre DMD e DMB mostram que pacientes com DMB apresentam mutações/deleções chamadas “em fase” já que mantém o quadro de leitura do RNAm (RNA mensageiro), gerando uma proteína defeituosa em tamanho ou quantidade, mas que é, em parte, funcional, enquanto que na DMD, as mutações/deleções ocorrem “fora de fase” uma vez que interrompem o quadro de leitura e o resultado é uma proteína truncada, não funcional e que é rapidamente destruída pela célula (Nobile *et al.*, 1997; O'Brien *et al.*, 2001, Zatz, 2002). A maioria dos quadros graves de DMD apresenta deleções nas regiões de ligação da distrofina com outras proteínas, como as regiões N- e C-terminal. Os quadros considerados leves podem apresentar até 50% de deleção do tamanho total do gene, desde que esta deleção ocorra na região central, o que levará a deleção da região em forma de bastão, preservando os sítios de ligação com as proteínas (Zatz, 2002).

I.2. Distrofina e Sistema Nervoso

A idéia de um funcionamento cortical anormal em pacientes com DMD já foi proposta por G.B. Duchenne na segunda metade do século XIX, quando ele examinou um menino de sete anos de idade com DMD e o descreveu como sendo lento e tendo habilidades de linguagem pobres. Porém, até o momento, a exata natureza da deficiência

cognitiva da DMD não está esclarecida (Blake *et al.*, 2000; Williams, Senior, David, Loughland, & Gordon, 2001). No entanto, os estudos revelam que tal deficiência cognitiva não é progressiva (Blake *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 2001). O resultado de testes de inteligência mostra-se rebaixado em aproximadamente um desvio padrão da média, sendo que 20-30% dos pacientes com DMD se enquadram na categoria de discreto retardo mental (Blake *et al.*, 2000).

A análise detalhada das habilidades de leitura e processamento na DMD mostra semelhanças às encontradas em crianças com dislexia disfônica, uma forma bastante freqüente de dislexia que ocorre durante o desenvolvimento, revelada como uma importante alteração do componente verbal (Billard, Gillet, Barthez, Hommet, & Bertrand, 1998).

Poucos estudos sobre o desempenho intelectual de pacientes com DMD foram encontrados na literatura. North *et al.*, (1996) descrevem 4 crianças com retardo mental e distúrbios psiquiátricos, sem fraqueza muscular que apresentaram diagnóstico posterior de DMB, mostrando que a perda das habilidades cognitivas pode ocorrer antes do aparecimento da fraqueza muscular. No entanto, Alho, Salzano & Zatz (1995) não encontraram uma relação entre os tipos de deleção com a severidade da DMD/DMB nem com os níveis de inteligência nos 50 sujeitos por eles avaliados. Além destas alterações, distúrbios de memória, atenção e emoção, também têm sido descritas (Billard *et al.*, 1998; Cotton, Crowe & Voudouris, 1998; Essex *et al.*, 2001; Marsh, 1972; Mehler, 2000; Wicksell *et al.*, 2004).

Anatomicamente, a morfologia macroscópica do córtex cerebral afetado pela DMD não mostra alterações. Entretanto, mudanças estruturais microscópicas do córtex

têm sido detectadas por alguns pesquisadores. Aumento da incidência de perda neuronal e gliose, além da orientação neural anormal com diminuição da arborização dendrítica de neurônios piramidais corticais em alguns sujeitos podem ser citados como exemplos de tais alterações corticais (Yoshioka, Okuno, Honda, & Nakano, 1980).

Um estudo recente utilizando tomografia por emissão de pósitrons (PET) de pacientes com DMD mostrou a presença de hipometabolismo cerebelar com envolvimento variável de áreas corticais de associação (Bresolin *et al.*, 1994). Outro estudo usando estimulação transcraniana e potenciais evocados evidenciaram uma diminuição da excitação cortical, também variável, em sujeitos com DMD (Di *et al.*, 1998).

I.3. Distrofina e Sistema Visual

Um dos aspectos do fenótipo da DMD que tem sido descrito por vários autores refere-se a alterações na atividade elétrica da retina, medidas pelo eletrorretinograma de campo total. Portadores de DMD apresentam, geralmente, uma resposta retiniana alterada a flashes de luz sob condição escotópica, mais precisamente uma redução da amplitude da onda-b. Esta alteração é atribuída a uma transmissão de sinal danificada entre os fotorreceptores e neurônios de segunda ordem que compõem a via ON de cones e bastonetes (Fitzgerald, Cibis, Giambone, & Harris, 1994; Fitzgerald *et al.*, 1999). Na literatura, estas alterações que ocorrem no ERG de sujeitos com DMD e DMB são semelhantes e variam de 50% a 88% dos sujeitos (Blake *et al.*, 2000; Girlanda *et al.*, 1997; Mehler, 2000).

Resultados obtidos em estudos recentes têm levado alguns autores a concluir que não existe correlação do ERG com a região da deleção do gene e que a gravidade da alteração no ERG reflete, simplesmente, a gravidade da doença muscular (Girlanda *et al.*,

1997; Pascual Pascual, Molano, & Pascual-Castroviejo, 1998). Outros estudos (Pillers *et al.*, 1999a; Pillers, 1999; Pillers *et al.*, 1999b; Pillers *et al.*, 1993b) mostram uma correlação positiva entre alteração no ERG e a região da deleção no gene. Correlações entre as regiões de deleção e a magnitude de redução da amplitude de respostas do ERG também foram encontradas por Schmitz & Drenckhahn (1997a) os quais relatam piores resultados no ERG para deleções entre os exons 44 e 62. Isto nos leva a acreditar que, até o presente momento, não está estabelecido de fato, se existe uma correlação fenotípica entre ERG e DMD.

Potenciais oscilatórios (POs) anormais também foram encontrados na DMD. A soma das amplitudes de todos os POs estava reduzida nestes sujeitos, em comparação com sujeitos normais no estudo realizado por Girlanda *et al.* (1997). Estes autores sugerem que tal resultado seja devido a alterações vasculares na retina interna que, indiretamente, estaria afetando a resposta das células de Muller e ganglionares. Neste mesmo estudo, os autores também relatam reduções de amplitude nos PVEs de flash. Embora tais alterações sejam observadas, clinicamente, os pacientes com DMD não relatam queixas visuais.

A retina é o sítio de expressão de isoformas completas de distrofina, codificadas pelos promotores "C" e "M", além de isoformas menores como a Dp260, Dp 140 e Dp71. As análises de correlação genótipo-fenótipo têm revelado que a Dp260, expressa a partir de um promotor controlador localizado no exon 30, é a isoforma que seria responsável pelas alterações nas transmissões sinápticas entre fotorreceptores e células bipolares e horizontais, resultando em um eletrorretinograma anormal (Drenckhahn, Holbach, Ness, Schmitz, & Anderson, 1996; Mechler & Victor, 2000; Pillers *et al.*, 1999a). Exames imunohistológicos têm demonstrado que a Dp260 se co-localiza com a distroglicana no

complexo sináptico da célula fotorreceptora, na camada plexiforme externa (Schmitz *et al.*, 1997a), especificamente na membrana da terminação axonal dos fotorreceptores (Drenckhahn *et al.*, 1996) (figura 4). Estudos mostram que a Dp140 e a Dp71 são expressas na camada plexiforme interna e nos vasos sanguíneos da camada de células ganglionares da retina (Drenckhahn *et al.*, 1996, Pillers *et al.*, 1999a). Por se localizarem em diferentes locais na retina Ino-ue *et al.*, (1997) e Howard *et al.*, (1998) sugerem que tanto a Dp260 como a Dp71 contribuem de maneira essencial, mas distinta para a eletrofisiologia retiniana. A Dp140, embora encontrada na retina, até o presente momento não foi relacionada aos processos fisiológicos da retina avaliados pelo ERG (Pillers *et al.*, 1999a).

A distrofina também é expressa no nível da membrana limitante interna e está envolvida na adesão da retina com o vítreo, sendo também significativamente expressa nas células de Müller (Schmitz *et al.*, 1997a; Claudepierre *et al.*, 2000b; Connors & Kofuji, 2002).

Segundo Mehler, (2000), a patologia retiniana existente na DMD pode resultar em várias formas sutis de disfunção cognitiva, incluindo problemas na discriminação figura/fundo e com a formação de representações semânticas apropriadas dos objetos. Estes déficits cognitivos podem contribuir para a patogênese e manifestações clínicas de desordens neurocomportamentais complexas, incluindo autismo e desordens no espectro dos déficits de atenção. Acreditamos que tal conclusão seja apenas especulativa uma vez

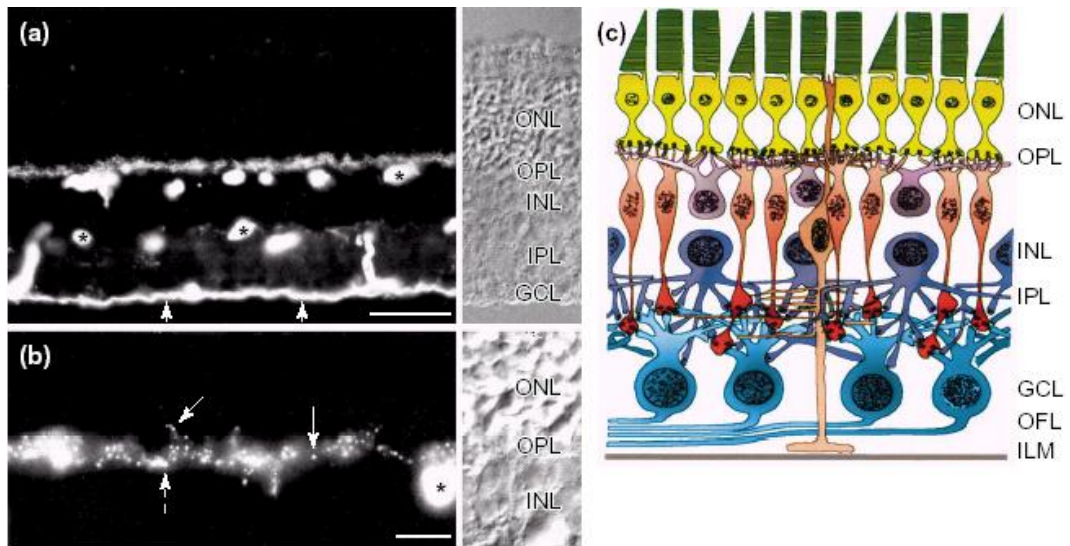


Figura 4: análise imunohistoquímica detecta a distrofina em 3 locais na retina de camundongos: (a) camada plexiforme externa, endotélio de vasos (asteriscos) e bordas entre retina neural e vítreo (setas brancas) refletindo uma alta concentração no botão terminal do axônio das células de Müller; em (b), ampliação para melhor demonstração da marcação observada na camada plexiforme externa, correspondendo aos terminais sinápticos de cones e bastonetes; (c) esquema didático da retina (Blake & Kröger, 2000).

Legenda: ONL – outer nuclear layer; OPL – outer plexiform layer; INL – inner nuclear layer; IPL – inner plexiform layer; GCL – ganglion cell layer; OFL – optic nerve fibre layer; ILM – inner limiting membrane.

que o autor está associando alterações de funções visuais corticais superiores com alterações retinianas e, até o momento, não se têm evidências de alterações sensoriais da visão as quais poderiam ser utilizadas como elo de ligação entre funções tão distantes e justificar tal raciocínio.

I.4. O Eletroretinograma

O eletroretinograma (ERG) é um registro das somas de sinais elétricos produzidos pela retina em resposta à estimulação por flash de luz de curta duração (Brown, 1968; Pillers, 1999). A absorção de luz pelas moléculas de pigmento visual no segmento externo dos fotorreceptores dispara a cadeia de fototransdução, cujo resultado é reduzir a despolarização da membrana do fotorreceptor – conhecida como “corrente do escuro” - pelo fechamento dos canais iônicos da membrana celular no segmento externo do fotorreceptor, causando uma hiperpolarização da célula (Brown, 1968). Através de contatos sinápticos entre os demais tipos, o resultado da ativação dos fotorreceptores é propagado pela rede neuronal da retina, gerando respostas tanto excitatórias quanto inibitórias e fluxos iônicos em células da glia, como por exemplo, as células de Müller. Todas estas alterações são refletidas em mudanças elétricas e podem ser em parte captadas por um eletrodo localizado na córnea numa resposta única, da retina como um todo.

O ERG é composto por 3 componentes principais: onda-a, onda-b e onda-c (Figura 5). A onda-a do ERG, uma onda negativa é uma derivada indireta da hiperpolarização dos fotorreceptores causada pela diminuição da corrente do escuro que circula do segmento externo para o segmento interno dos fotorreceptores, pelo espaço extracelular. Em seguida, observa-se uma onda-b positiva que parece refletir a atividade de processos proximais das células de Müller em resposta ao rápido aumento da concentração de

potássio na retina interna e indiretamente reflete as atividades das células bipolares tipo ON (Brown, 1968). Independentemente do mecanismo exato, a onda-b nos informa sobre a atividade elétrica induzida pela luz nas células pós-sinápticas aos receptores. A onda-b é devida a um aumento da corrente extracelular e, então, aparece como uma positividade corneana (Wachtmeister, 1998).

A onda-b é também afetada pelas células bipolares do tipo OFF e pela atividade de neurônios retinianos de terceira ordem (células amácrinas, interplexiformes e ganglionares). Esta contribuição pode ser isolada em laboratório pelo uso de drogas específicas mas, na situação clínica, a onda-b do ERG de um paciente reflete a contribuição de todas estas células somadas (Wachtmeister, 1998).

A onda-c positiva que ocorre após a onda-b indica as diferenças no grau de hiperpolarização do epitélio pigmentar, causadas pelas mudanças na concentração de potássio subretiniano e pela hiperpolarização passiva da porção distal das células de Muller (Brown, 1968).

O fluxo de informação dos fotorreceptores para os neurônios de segunda ordem são distintos quanto à segregação em vias ON e OFF. Bastonetes são exclusivamente conectados a células bipolares do tipo ON, enquanto que os cones fazem contato sináptico tanto com células bipolares despolarizantes do tipo ON como com as células bipolares hiperpolarizantes do tipo OFF (Wachtmeister, 1998).

Atualmente, um índice tem sido utilizado para a avaliação da integridade funcional da retina. Este índice quantifica a relação entre a onda-a e a onda-b obtidas na resposta máxima adaptada ao escuro (Perlman, 1983). Tal análise é baseada na fisiologia da retina e na origem do ERG, pois, sabendo-se que a onda-a reflete as atividades de

fotorreceptores e que a onda-b é originada de neurônios pós-sinápticos, ela pode ser utilizada como um indicador funcional da integridade retiniana. Em patologias que afetam os fotorreceptores a onda-a é de menor amplitude, o que acarreta como consequência a redução da onda-b, mas a relação b/a freqüentemente é normal. Alterações da transmissão de sinais originadas na camada plexiforme externa irão causar uma relação b/a anormal (Perlman, 1983). Em sujeitos normais, a relação b/a é maior do que 2. Quando este valor apresenta valores menores do que 1, recebe o nome de ERG negativo (Pascual Pascual *et al.*, 1998; Perlman, 1983; Pillers, 1999).

Os potenciais oscilatórios (PO) foram observados, primeiramente em 1937 por Granit e Münshterhjelm, como duas oscilações (O1 e O2) na região ascendente da onda-b. Posteriormente em 1953, Cobb e Morton observaram que estas duas oscilações correspondiam, após a filtragem do sinal, de quatro a seis pequenas ondas do ERG registrado no olho humano. Estudos posteriores mostraram que os POs são indicadores mais sensíveis de função retiniana central do que periférica, refletindo principalmente a atividade de células das regiões para- e perifoveal. Esta condensação da somação dos sinais dos POs para as regiões centrais é, possivelmente, mediados pelas células amácrinas (Wachtmeister, 1998).

Estudos em pombos e macacos revelaram que os POs são gerados na camada plexiforme interna presumivelmente pelos axônios terminais das células bipolares, pelos processos das células amácrinas e pelos dendritos das células ganglionares. Estruturas mais profundas da retina como fotorreceptores e células horizontais muito provavelmente não participam dos POs (Wachtmeister, 1980).

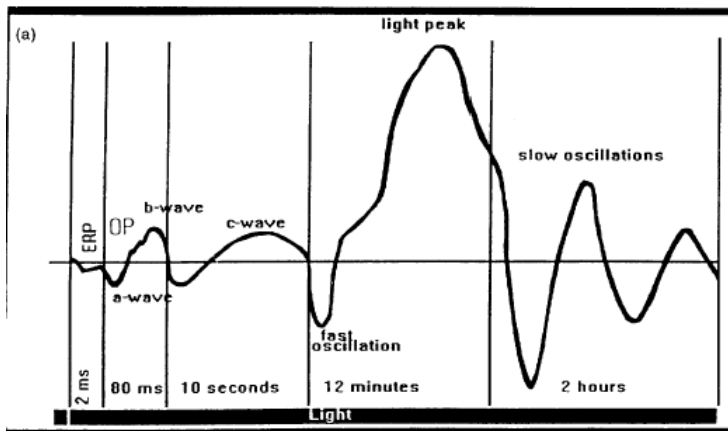


Figura 5: figura ilustrativa mostrando as ondas que compõem o eletroretinograma de campo total (Wachmeister, 1998). Embora vários componentes possam ser identificados ao longo do tempo após o flash de luz que dispara a resposta retiniana, os 3 principais são as ondas-a, -b e -c.

Tabela 2: Classificação dos Potenciais Oscilatórios

PO	Origem Provável	Fotorreceptor	ON-OFF
1	amácrinas	Bastonetes	ON
2	bipolares	Bastonetes	ON
3	bipolares	Baston. - cones	ON
4	ganglionares interplexiform	Cones	OFF

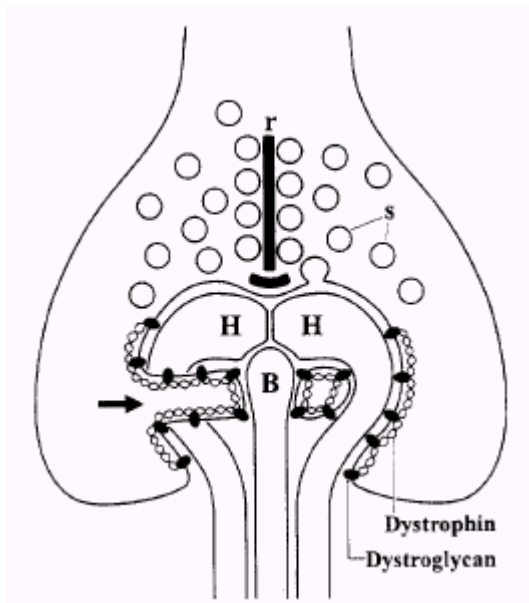


Figura 6: figura ilustrativa mostrando a localização da distrofina na invaginação do botão sináptico de um cone, onde **r** é a faixa sináptica, **s** são as vesículas sinápticas, **H** são células horizontais e **B** células bipolares do tipo-ON (Schimtz & Drenckhahn, 1997) A distrofina se localiza na membrana celular dos cones.

O primeiro PO reflete a atividade de retroalimentação inibitória gerada na camada plexiforme interna para a externa, muito provavelmente realizada pelas células amácrinas. Os segundo e terceiro POs parecem estar associados com a despolarização das células bipolares do sistema de bastonetes. O quarto e quinto POs são provavelmente gerados por células ganglionares e células interplexiformes do sistema dos cones. Portanto, lesões envolvendo o sistema dos bastonetes podem ser observadas pela redução de PO2, enquanto que lesões na via dos cones são evidenciadas pela redução de PO4. Interações entre as vias escotópicas e fotópicas podem ser estudadas pelas alterações que ocorrem em PO3 (Wachtmeister, 1987; Wachtmeister, 1998).

A segregação entre as vias visuais ON e OFF também está presente nos POs. Os POs considerados iniciais (PO1 a PO3) que representam a ondulação inicial (O1) observada na onda-b da resposta máxima, parecem refletir a atividade de células bipolares do tipo ON (despolarizante) da via dos bastonetes, enquanto que os POs considerados tardios (PO4 e PO5) representando a segunda ondulação (O2) da resposta máxima, seriam gerados pelas atividades das células bipolares do tipo OFF (hiperpolarizante) da via dos cones (Wachtmeister, 1987; Wachtmeister, 1998) (tabela 2).

1.4.1. O Eletrorretinograma na DMD

As anormalidades mais evidentes no ERG de pacientes com DMD ocorrem nas condições escotópicas (adaptados ao escuro). O ERG escotópico obtido nos pacientes com DMD é caracterizado por uma completa supressão da onda-b ou uma redução da razão onda-b/onda-a para valores abaixo de 1 (Pillers, 1999). Isto sugere uma disfunção da capacidade de resposta das células bipolares do tipo ON à hiperpolarização dos bastonetes

(Pillers *et al.*, 1999a) identificando a camada plexiforme externa como o principal sítio de atuação da distrofina (D'Souza *et al.*, 1995; Pillers *et al.*, 1993a; Yang *et al.*, 2001).

Não tão evidente quanto às alterações observadas nas respostas escotópicas, o ERG das respostas dos cones sob condições fotópicas também revela uma menor amplitude e maior latência da onda-b, nos pacientes com DMD quando comparados com sujeitos normais (Fitzgerald *et al.*, 1994; Pillers *et al.*, 1999a; Schmitz *et al.*, 1997a).

Por estudos de imunocitoquímica, observou-se que a distrofina Dp260 localiza-se na camada plexiforme externa, camada que contém os complexos sinápticos das células fotorreceptoras, embora marcações também ocorreram na camada plexiforme interna e membrana limitante interna (Claudepierre *et al.*, 2000b; Claudepierre *et al.*, 2000a; Drenckhahn *et al.*, 1996; Howard *et al.*, 1998; Muntoni, Torelli, & Ferlini, 2003; Schmitz & Drenckhahn, 1997b; Ueda, Gohdo, & Ohno, 1998). Dois tipos principais de sinapses estão presentes nesta camada: as sinapses invaginadas e as sinapses basais. As sinapses invaginadas são assim chamadas uma vez que os dendritos pós-sinápticos das células bipolares e horizontais estão localizados internamente em uma cavidade que é criada por uma invaginação da membrana pré-sináptica do fotorreceptor (Fitzgerald *et al.*, 1994). A distrofina se encontra em grande concentração na membrana plasmática da invaginação do fotorreceptor (Schmitz *et al.*, 1997a).

Esta invaginação ocorre pela presença de faixas sinápticas que apresentam um formato de disco curvado como uma “ferradura de cavalo” ao redor da cavidade. Estas faixas são componentes estruturais especializados da zona ativa do fotorreceptor na qual ocorre a exocitose das vesículas sinápticas. O processo de uma célula bipolar do tipo ON e

dois processos de células horizontais fazem contato com esta zona ativa para formar a tríade pós-sináptica (figura 6).

Os cones podem apresentar até 20 invaginações com várias zonas ativas em cada uma, enquanto que os bastonetes apresentam, tipicamente, só uma sinapse invaginada com uma zona ativa (Schmitz *et al.*, 1997a). Todas as células bipolares que enviam seus dendritos para dentro da invaginação pertencem à via visual ON da retina e despolarizam em resposta à iluminação. Células bipolares que fazem conexão com os fotorreceptores fora da invaginação pertencem à via visual OFF e hiperpolarizam em resposta à iluminação. Existe, portanto, uma clara correlação entre os diferentes tipos de sinapses e suas diferenças fisiológicas (Schmitz *et al.*, 1997a). Como mencionado anteriormente, a onda-b do ERG está alterada nos pacientes com DMD, principalmente nos sujeitos que apresentam deleção downstream ao exon 30; esta onda parece ser gerada principalmente pela atividade elétrica mediada pelas células bipolares do tipo ON, ou seja, pelas células invaginadas. Uma vez que as alterações no ERG são relacionadas com as respostas das células bipolares tipo ON a distrofina pode ter um papel importante em certos aspectos da neurotransmissão do fotorreceptor (Schmitz *et al.*, 1997a).

Girlanda *et al.*, (1997) encontraram alterações significativas na soma dos potenciais oscilatórios dos ERGs de campo total em 80% dos pacientes DMD. Neste mesmo estudo, os autores também mostraram alterações no PVE: aumento na latência de P100 em 19% dos PVEs de flash realizados nos mesmos indivíduos. Por outro lado, Pascual Pascual *et al.*, (1998) não encontraram alterações entre sujeitos normais e com DMD no PVE de flash.

Portanto, correlações entre genótipo e fenótipo para o ERG de sujeitos com DMD vêm sendo investigadas, mantendo-se até o presente momento, sem uma conclusão definida a respeito. Alguns estudos encontram relação entre o local da deleção e a magnitude das alterações no ERG (D'Souza *et al.*, 1995; Pillers *et al.*, 1999a; Ino-ue *et al.*, 1997; Rodius *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2001) enquanto outros autores relatam alterações no ERG, mas não encontram relação das mesmas com o local de deleção (Girlanda *et al.*, 1997; Pascual Pascual *et al.*, 1998).

I.5. Visão de Cores

I.5.1. Teorias da Visão de Cores

O processamento cromático pelo sistema visual pode ser entendido em dois níveis. No primeiro nível, dos fotorreceptores, existem 3 classes de cones, cada qual com um pico de absorção espectral diferente (cones L - pico nos comprimentos de onda longo; cones-M - pico nos comprimentos de onda médio; cones S - pico nos comprimentos de onda curto). A idéia de que todas as cores poderiam ser compostas pela mistura de 3 primárias (verde, vermelho e azul) havia sido proposta por Young-Helmholtz (1802; apud Mollon, 2003). Helmholtz chegou a sugerir a existência de 3 receptores para as diferentes cores, numa época em que não se tinha conhecimento do número de tipos de cones (Mollon, 1997). Foi somente na década de 1960 que ocorreu a descoberta de que temos três tipos de cones, simultaneamente em dois laboratórios (Wald, 1964 ; Brown & Wald, 1964; Marks, Macnichol & Dobbelle, 1964).

O segundo estágio do processamento cromático é chamado de pós-receptoral e se organiza constituindo três canais principais. Neste estágio, a informação cromática é agrupada em um canal que constitui um canal de luminância e em dois outros canais, nos

quais há oposição para cor: um canal L - M, no qual a informação dos cones L opera em oposição à dos cones M, e um canal S - (L+M) no qual a informação dos cones S, se opõe à soma das ativações das vias dos cones L e M até as células ganglionares (Palmer, 1999).

1.5.2. Mecanismos Fisiológicos

Como Young e Helmholtz propuseram, existem três tipos de cones na retina humana, cada um com um fotopigmento diferente para absorção de luz (Mollon, 2003). Os espectros de absorção destes três tipos de cones são conhecidos, podendo-se calcular a porcentagem de luz absorvida em cada comprimento de onda do espectro visível. Os resultados mostraram que o pico de absorção do cone para comprimentos de onda curto (cone-S) ocorre, aproximadamente, em 440 nanômetros (nm), o do cone para comprimentos de onda médio (cone-M) 530nm e do cone para comprimentos de onda longo (cone-L) 565nm (microespectrofotometria Brown & Wald, 1964; Wald, 1964; Marks, MacNichol e Dobbelle, 1964; medidas eletrofisiológicas, De Valois, Jacobs & Abramov, 1964; eletrofisiologia de sucção, Schnapf, Kraft, & Baylor, 1987). Entretanto, o número de cada tipo de cone e sua distribuição espacial pela retina não é uniforme. A quantidade de cones-S varia de 5-10% do total de cones e, acredita-se que haja o dobro de cones-L, comparado com cones-M. A proporção entre os cones-L -M e -S é aproximadamente de 10:5:1 (De Valois & De Valois, 1993), mas a razão L:M varia de indivíduo para indivíduo. Além disso, estes autores observaram que os receptores na área foveal de 0,1° de ângulo visual são exclusivamente cones-M e -L e a proporção de cones-S

aumenta de 0,1 a 1,0° do centro. A proporção entre os três tipos de cones atinge nessa excentricidade um valor constante.

O que diferencia os cones é uma proteína chamada opsina que existe em seu segmento externo. Indivíduos com perdas congênitas na visão de cores - monocromatas (acromatopsia ou ausência de visão de cores) ou dicromatas (visão de cores mediada por dois tipos de cones, ao invés de três) - deixam de expressar ou de ter o gene para uma ou mais opsinas que caracterizam os diferentes tipos de cones. Protanopes perdem o fotopigmento dos cones-L, deuteranopes perdem o fotopigmento dos cones-M e os tritanopes perdem o fotopigmento dos cones-S (Neitz *et al.*, 2000). Tricromatas anômalos têm os três sistemas de cones funcionando, porém, os pigmentos do cone-L ou do cone-M ou de ambos parecem ser diferentes daqueles dos chamados tricromatas normais (Bollinger, Sjoberg, Neitz, & Neitz, 2004). Muitas vezes a função de absorção espectral do pigmento do cone-M é deslocada na direção da função do cone-L e menos freqüentemente, ocorre o contrário (Neitz, Neitz, & Jacobs, 1993). Neste caso, o resultado observado nos testes de visão de cores é o de um tricromata anômalo, para o qual as misturas de cores são diferentes dos tricromatas normais e dependem em particular do pigmento que eles apresentam (Neitz *et al.*, 2000).

Os genes que codificam as opsinas M e L se localizam no locus 28 do braço longo do cromossomo X (Xq28). Os genes dos fotopigmentos dos cones M e L são altamente homólogos e as opsinas codificadas apresentam uma diferença em apenas 15 aminoácidos, sete dos quais são os responsáveis pela diferença de absorção espectral de 30nm existente entre estas opsinas (Deeb *et al.*, 2000). Durante o processo de transcrição, o primeiro gene é sempre o codificador da opsina L enquanto os genes seguintes codificam a opsina M ou

são genes híbridos L e M. Estes genes, que podem variar em número de 2 a 10, são compostos por 6 exons. O exon 5 parece ser o responsável por aproximadamente 2/3 do deslocamento espectral entre as opsinas M e L. Genes híbridos L/ M são associados com defeitos de visão de cores protan (protanomalias) e os M/ L com defeitos de visão de cores deutan (deuteranomalias) (Nathans *et al.*, 1986).

Estudos da fisiologia da visão de cores foram também realizados em outros níveis do processamento neural. De Valois, Abramov, & Jacobs (1966) mediram respostas no corpo geniculado lateral de primatas (*Macaca macaca*) e descobriram células que responde seletivamente para cor, nas quais as respostas para comprimentos de onda eram incompatíveis com a teoria tricromática mas se comportavam conforme os padrões previstos pela teoria dos processos oponentes proposta por Hering em 1878, ou seja, em canais de oponência cromática. Estas células, que respondem com oponência (excitação/inibição) para estímulos de cor verde-vermelho, fazem parte da via visual parvocelular (Rodieck, Binmoeller, & Dineen, 1985; Sartucci *et al.*, 2003). As células que respondem em oposição para estímulos azul e amarelo compõem a via koniocelular, recentemente descrita (Dacey & Lee, 1994; Martin, White, Goodchild, Wilder, & Sefton, 1997). Pesquisas posteriores mostraram que este padrão de resposta em oponência já está presente nos estágios iniciais do processamento da informação de cor que ocorre nas células bipolares e ganglionares da retina (Ross & Mingolla, 1998).

No nível cortical, o processamento cromático se torna cada vez mais complexo. Neurônios visuais da área visual primária (V1) apresentam um padrão de resposta em dupla oponência, como ilustrado na figura 7 (Johnson, Hawken, & Shapley, 2004).

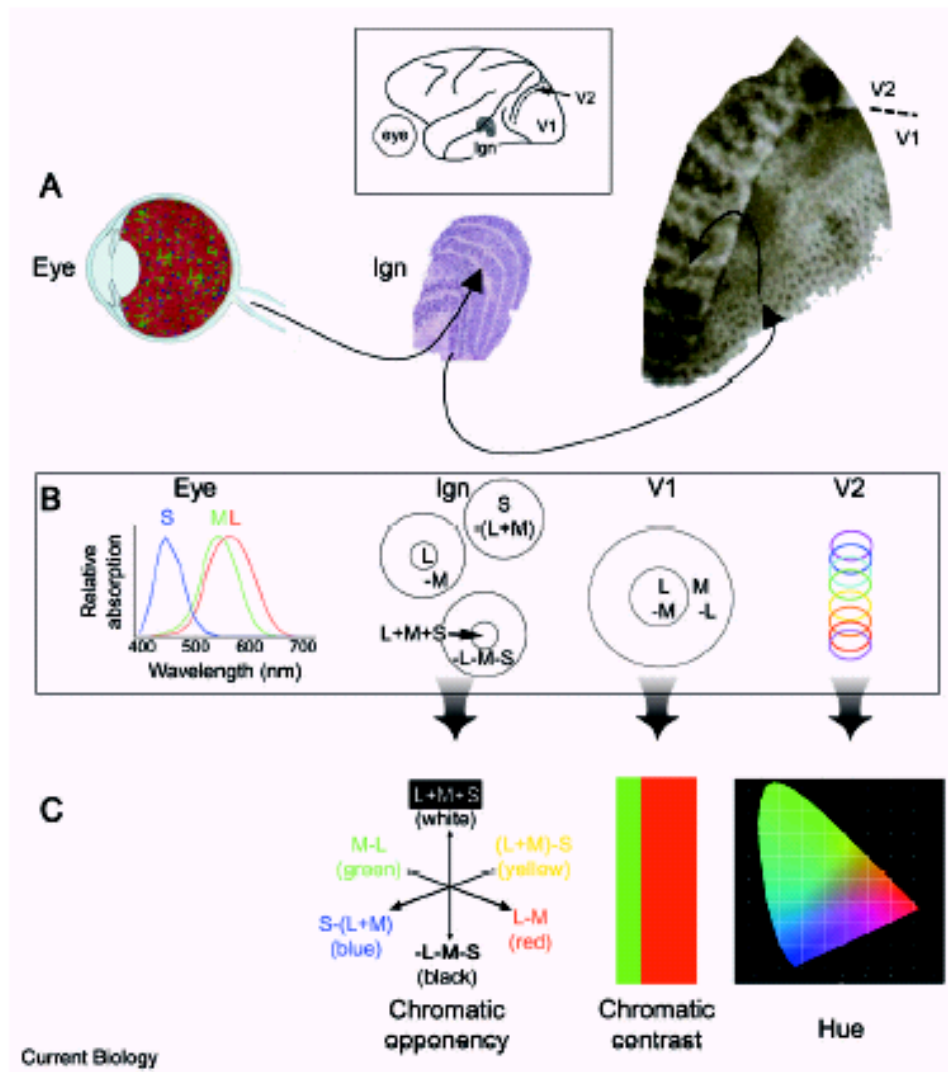


Figura 7: figura ilustrando a anatomia (A), fisiologia (B) e percepção (C) da visão de cores. A luz ativa as três classes de cones – L, M e S - de acordo com seus picos de absorção relativos (“Eye” em B). Os sinais dos cones são comparados por células no núcleo geniculado lateral (“Lgn” em B). Algumas células têm campos receptivos excitados por cones-L e suprimidos por cones-M (célula +L-M). Outras têm campos excitados por cones-S e suprimidos por cones (L+M) (células +S-(L+M)). Esta oponência cromática sustenta as evidências perceptuais (C) uma vez que não existem cores amarelo-azuladas nem vermelho-esverdeadas. Células corticais especializadas de “dupla oponência” comparam razões de cones em uma parte do espaço visual com outras de áreas adjacentes do espaço visual (córtex visual primário - “V1” em B); estas são presumivelmente construídas pelas células de cor do Lgn e possibilitam cálculos de contraste cromático – vermelho parece mais intenso perto do verde (contraste cromático em C). Sinais de cores são transmitidos para as faixas estreitas de V2 (A, direita) onde matizes específicas são representadas em faixas para cores (“V2” em B) que preserva a anatomia de V2. Isto deve subservir nossa percepção de matizes (Hue em C). O pequeno quadro superior mostra o córtex de um macaco prego (squirrel) do qual foi extraído o corte do córtex visual marcado pela enzima citocromo oxidase. Note em V1 as bolhas e o padrão de faixas largas e escuras em V2 (Conway, 2003).

Entretanto, mesmo este modelo de dupla oponência não responde, ainda, a questões importantes como, por exemplo, porque alguns comprimentos de onda na região do violeta parecem perceptualmente avermelhados se o cone-L não está sendo estimulado por esta região espectral? Outros modelos para o processamento cromático tentando solucionar questões semelhantes a esta estão em desenvolvimento envolvendo estágios posteriores às vias visuais corticais primárias V1 e V2 (De Valois e De Valois, 1993).

1.5.3. Visão de Cores na DMD

Embora o eletrorretinograma de pacientes com DMD apresente alterações (v. revisão em Schmitz & Drenckhahn, 1997a), encontramos poucos estudos que avaliaram funções visuais desses pacientes.

Em 1974 dois estudos verificaram simultaneamente as possibilidades de associação entre os genes da DMD e da visão de cores. Zatz *et al.* (1974) encontraram associação entre defeitos de visão de cores, mais especificadamente os defeitos deutan, com a DMB, mas uma fraca possibilidade do defeito ocorrer em associação com a DMD. Neste estudo, os métodos de avaliação da visão de cores foram: as placas de Ishihara e o AO H-R-R. Simultaneamente, Skinner, Smith & Emery (1974) também encontraram associações entre defeitos deutan na visão de cores e DMB e fraca possibilidade associação com DMD, utilizando os mesmos métodos. Tais resultados levaram estes autores a acreditar que os genes para DMD e DMB ocupavam diferentes locais no cromossomo X. Após a localização do gene da DMD/DMB no braço curto do cromossomo X em 1981 (Zatz *et al.*, 1981) constatou-se alguns anos depois, em 1984 (v. Zatz 2002) que a DMD e a DMB eram alélicas - ocupam o mesmo loco no cromossomo

X. No entanto, somente depois da clonagem do DNA é que a distrofina foi identificada (Hoffman, Brown & Kunkel, 1987).

Três anos depois, Gisburg & Long (1977) encontraram uma associação importante entre a DMD e o defeito protan em uma família. A probabilidade calculada pelos autores para esta família de um sujeito ter DMD e defeito protan foi de 25%, um valor acima do esperado para a população normal.

Encontramos apenas um trabalho que avaliou clinicamente a situação visual dos sujeitos com DMD. Sigismund *et al.* (1994) estudaram a visão de 26 pacientes com DMD não tendo encontrado alterações refracionais, na motilidade ocular e na acuidade visual de Snellen. Destes, 21 sujeitos foram avaliados em testes de visão de cores e apenas 1 apresentou defeito para verde-vermelho no teste de Ishihara. Os autores acreditam que o defeito encontrado não tem associação com a patologia. Eles ainda mencionam na seção de métodos, também terem usado o teste de Farnsworth-100hue e o AO H-R-R porém, os resultados destes testes não são apresentados neste trabalho.

A constatação de que pouca atenção foi dedicada ao estudo controlado de funções visuais em pacientes com DMD motivou o presente estudo, que focaliza a visão de cores e de contrastes nessa patologia.

I.5. Sensibilidade ao Contraste de Luminância

A medida mais comumente usada na clínica para avaliar a visão humana é a acuidade visual, que consiste na capacidade de resolução de estímulos com alto contraste. Determina-se a frequência espacial mais alta que o indivíduo consegue ver, com o mais alto nível de contraste (Rovamo *et al.*, 1999). Na vida cotidiana, porém, as discriminações visuais necessárias envolvem muitos outros níveis de contraste e muitas frequências

espaciais. Pode-se medir, para cada frequência espacial, o nível de contraste limiar necessário para que seja detectada (Cornsweet, 1970). A recíproca desses limiares é a sensibilidade e a curva relacionando-os com as frequências espaciais, a função de sensibilidade ao contraste de luminância. Nesta função observa-se que a sensibilidade ao contraste aumenta com a frequência espacial até atingir um pico e depois diminui. A acuidade limiar corresponde ao último ponto da curva, correspondente à maior frequência espacial que pode ser vista (Rovamo *et al.*, 1999).

Os 2 parâmetros necessários para medir a sensibilidade ao contraste são:

Contraste de luminância – pode ser expresso na seguinte equação: $C = (L_{max} - L_{min}) / (L_{max} + L_{min})$, onde C é o contraste, podendo apresentar valores entre 0 e 1, L_{max} é a luminância máxima e L_{min} a luminância mínima. Muitas vezes, o C também é referido como modulação, contraste de Raleigh ou Michelson. Em um estímulo composto por grades, o limiar de contraste é o mínimo contraste requerido para a detecção do padrão.

Frequência espacial – uma lista luminosa e outra escura em um padrão caracteriza um padrão de grades e representa um ciclo. A frequência espacial é o número de ciclos subtendido em um grau de ângulo visual. Uma baixa frequência espacial consiste de listas largas e uma alta frequência espacial de listas finas. A faixa de frequências espaciais às quais o olho humano é sensível se estende aproximadamente de 0.1 a 30 ciclos por grau. O pico de sensibilidade ocorre nas frequências espaciais entre 3 e 8 ciclos por grau (Cornsweet, 1970; Palmer, 1999). A sensibilidade diminui para ambas as direções da função, ou seja, tanto para as frequências espaciais mais altas como para as mais baixas (figura 8).

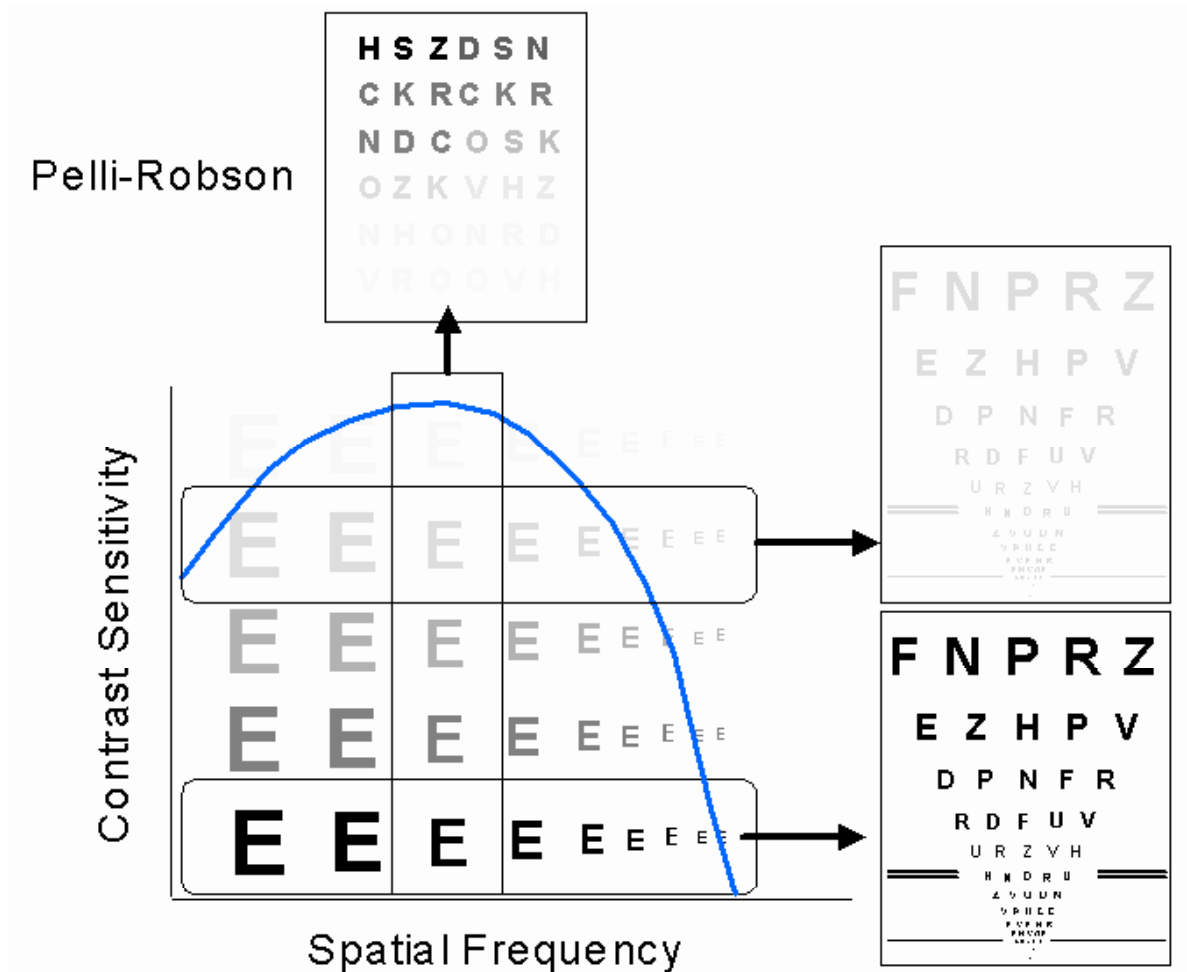


Figura 8: Ilustração mostrando as duas variáveis existentes na função de sensibilidade o contraste (A): a frequência espacial variando no eixo das ordenadas e a sensibilidade ao contraste variando no eixo das abscissas. A linha azul representa a sensibilidade obtida em adultos normais. Acima, observamos a ilustração da tabela de Pelli-Robson, muito utilizada na clínica para a avaliação da sensibilidade ao contraste. Vale notar que o único parâmetro que se modifica é o nível de contraste. Nas 2 ilustrações do lado direito temos o exemplo de duas tabelas de acuidade visual, onde o parâmetro que se modifica são as frequências espaciais, tendo o mesmo nível de contraste para todas as testadas.

A sensibilidade ao contraste é a recíproca do limiar de contraste (quantidade mínima de contraste necessário para se ver um padrão). Ela pode ser expressa como a recíproca da porcentagem de contraste numa escala de decibéis (dB) na qual a sensibilidade ao contraste em $\text{dB} = -20\log_{10}C$ (Waugh S. J. & Levi D.M., 1995). Com freqüência, perdas de sensibilidade ao contraste são expressas em decibéis (Palmer, 1999).

A função de sensibilidade ao contraste tem uma forma de banda de passagem, com a maior sensibilidade nas freqüências espaciais médias, e redução de sensibilidade tanto nas baixas como nas altas freqüências espaciais (Cornsweet, 1970). Esta diminuição nas baixas freqüências espaciais é atribuída ao mecanismo de inibição lateral (Rovamo *et al.*, 1999). A diminuição da sensibilidade nas altas freqüências é devida à perda de resolução causada pela própria óptica ocular, uma vez que a imagem é distribuída como uma função de espalhamento pontual que, progressivamente, atenua contrastes com o aumento da freqüência espacial (Cornsweet, 1970; Rovamo *et al.*, 1999).

Uma vez que a função de sensibilidade ao contraste depende da capacidade do sistema óptico de reproduzir os estímulos, ela pode ser considerada como uma medida indireta da função de transferência de modulação do sistema visual (*MTF*) (Palmer, 1999).

A medida da sensibilidade ao contraste tem grande aplicabilidade clínica uma vez que desvios específicos da curva podem auxiliar na estimativa das causas da doença: ópticas ou neurais (Adams & Courage, 2002). Por este motivo, o teste de sensibilidade ao contraste tem se tornado uma importante ferramenta para a análise científica ou clínica do sistema visual uma vez que proporciona mais informação a respeito da estrutura, função e das doenças do sistema visual do que o resultado da função visual espacial medido apenas pela acuidade de reconhecimento - acuidade de Snellen (Rovamo, *et al.*, 1999).

A sensibilidade ao contraste também pode ser medida no domínio temporal. A variação da sensibilidade ao contraste em função da frequência de intermitência da luz (flicker) designa a função de sensibilidade ao contraste temporal (Palmer, 1999). Sob condição de alta luminância (fotópica), o olho humano tem o seu pico de sensibilidade para esta função entre 15 e 20 Hz. Nesse ponto, sujeitos normais necessitam de menos de 1% de contraste de luminância para detectar o estímulo intermitente (Tyler & Hamer, 1990). Se medirmos a maior capacidade de resolução temporal possível, com estímulos de máximo contraste, encontraremos uma frequência temporal que varia de acordo com o nível de luminância. Estes limiares recebem o nome de frequência crítica de fusão (FCF) e, em sujeitos normais os valores máximos de FCF, correspondentes às intensidade de luz mais altas, situam-se por volta de 60 Hz (Tyler & Hamer, 1990). Dependendo das condições de estimulação, a função que relaciona a FCF e a luminância atinge um platô nas altas intensidades ou um leve decréscimo (Graham, 1965). A FCF sob condições escotópicas atinge valores muito mais baixos, por volta de 15 Hz, e a sensibilidade máxima ao contraste tem uma perda significativa caindo para 20% de contraste (Tyler & Hamer, 1990).

A participação das 3 classes de cones na geração da sensibilidade ao contraste espacial e temporal é diferente. A informação de luminância é dada pela soma das respostas dos cones L e M, ou seja, duas luzes terão igual luminância quando causarem a mesma quantidade de absorção de fótons na população de cones L e M, sem levar em consideração sua distribuição espectral relativa (Kaiser & Boynton, 1996). A visão espacial em níveis fotópicos depende, portanto, primariamente, da atividade dos cones L e M. Nas baixas frequências espaciais, os cones S podem ter uma pequena contribuição. Em

freqüências espaciais acima de 10cp/g, sua contribuição é nula (Williams, Collier & Thomson, 1983). Acredita-se que a base fisiológica da inferioridade dos cones S para esta função visual seja sua baixa densidade de distribuição espacial na retina e ausência na região central da fóvea (Williams, Collier & Thomson, 1983).

Na função de resolução temporal a participação dos cones S também parece ser inferior à dos cones L e M. Esta pequena participação ocorre principalmente para as baixas freqüências temporais (Kaiser & Boynton, 1996).

II. Objetivos

Uma vez que as alterações no eletrorretinograma são classicamente conhecidas nos sujeitos com DMD, e ainda não se conhecem possíveis perdas nas funções visuais destes sujeitos, o presente estudo tem por objetivos:

1 – estudar a visão de cores por um teste computadorizado recente, o Teste de Cores de Cambridge (Cambridge Colour Test – CCT) e comparar os resultados com os de métodos psicofísicos tradicionais: testes de pranchas– teste de visão de cores de Ishihara e American Optical H-R-R e anomalocópio de Neitz

2 – estudar a visão espacial pela medida psicofísica da sensibilidade ao contraste de luminância espacial e temporal;

3 - estudar o eletrorretinograma de campo total, incluindo a análise individual dos potenciais oscilatórios buscando identificar possíveis sítios de alteração do fluxo de sinais neuronais destes pacientes;

4 - verificar se as alterações encontradas no sistema visual (fenótipo) pelos testes acima apresentam correlação com a região da deleção no gene (genótipo).

III. Sujeitos e Metodologia

III.1. Sujeitos

Em nosso estudo, foram avaliados 54 meninos com diagnóstico de Distrofia Muscular de Duchenne com idade variando de 9 a 21 anos de idade (média= 14,2, dp= 4,1 anos), encaminhados pela Associação Brasileira de Distrofia Muscular (ABDIM). Todas as crianças apresentavam exame de fundo de olho normal. Caso o sujeito utilizasse óculos, estes foram utilizados nas medidas psicofísicas.

Estes sujeitos foram divididos em 3 grupos, de acordo com a condição genética que apresentavam: grupo 1 (n= 20) - sem deleção no gene; grupo 2 (n= 7) - com deleção upstream ao exon 30; grupo 3 (n= 27) - com deleção downstream ao exon 30;

O grupo controle foi composto por 35 jovens do sexo masculino sem diagnóstico clínico de DMD e condições oftalmológicas dentro dos padrões de normalidade, com idade variando de 10 a 23 anos (média= 15,4, dp= 3,9). Como número de sujeitos com DMD e de controles variou em cada teste, decidimos apresentar os dados referentes à característica da amostra para cada teste, em tabelas separadas.

III.2. Avaliação Genética

A avaliação genética visando identificar os possíveis sítios de deleções no gene da distrofina foi realizada no Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências (IB) da Universidade de São Paulo. Esta avaliação foi realizada por profissionais especializados que nos enviaram a informação das regiões de deleção no gene de cada sujeito.

III.3. Metodologia da Visão de Cores

III.3.1. Sujeitos e Equipamento: Cambridge Colour Test

A avaliação da discriminação cromática foi realizada em todos os sujeitos (tabela 3). Para avaliarmos a capacidade de discriminação cromática utilizamos a versão comercial do Cambridge Colour Test (CCT v2.0 - Cambridge Research Instruments, Rochester, UK), instalado a um microcomputador (Dell Dymension XTC - 600), com uma placa gráfica VSG 2/5 (Cambridge Research Instruments, Rochester, UK). Os estímulos foram gerados em um monitor colorido de alta resolução, Sony FD Trinitron modelo GDM-F500T9. Os sujeitos permaneciam sentados a 3 metros de distância do monitor, com a sala totalmente escura.

Os estímulos eram semelhantes aos que constituem as placas pseudoisocromáticas do teste de Ishihara. O alvo consistia de uma letra “C” que diferia em cromaticidade do fundo (coordenadas 0.1977, 0.4689 em $u'v'$ do espaço de cor CIE 1976). A abertura da letra subtendia 1° de ângulo visual a esta distância.

O alvo e o fundo eram constituídos de pequenos círculos com variados tamanhos e com 6 níveis de luminâncias entre 8 e 18 cd.m^{-2} aleatoriamente distribuídos. Estas duas tácticas garantiam que o sujeito detectasse a mira apenas pela visão de cores, impossibilitando-os de usar artefatos de contorno ou de diferenças de luminância (figura 9).

III.3.2. Protocolo de Testagem

O alvo é apresentado aleatoriamente em uma de quatro direções: superior, inferior, direita e esquerda, durante 6 segundos. Durante este intervalo de tempo, o sujeito

Tabela 3: Características dos sujeitos com Distrofia Muscular de Duchenne

Diagnóstico	Idade	Deleção	Trivector			Área Elipse	Ângulo Elipse	Classif. CCT
			Protan	Deutan	Tritan			
DMD	9	47-52	99	105	209	4441,1	23,0	protanomalo
DMD	9	48-52	141	134	118	1251,5	46,8	protanomalo
DMD	15	50	88	89	110	881,2	52,1	normal
DMD	15	47-48	69	79	117	708,8	57,7	normal
DMD	12	50	81	64	81	478,5	105,5	normal
DMD	12	50	156	174	149	1498,9	145,7	deuteranomalo
DMD	13	47-50	117	120	205	3365,9	81,6	difuso
DMD	8	50	119	107	82	1264,7	67,3	protanomalo
DMD	9	45	102	74	122	955,1	62,9	protanomalo
DMD	16	49-50	72	89	80	528,0	28,6	protanomalo
DMD	9	43	281	195	144	2827,0	164,2	deuteranomalo
DMD	9	47-52	139	46	103	747,2	59,6	protanomalo
DMD	18	46-55	36	35	53	257,5	50,6	normal
DMD	13	51	87	91	136	627,5	52,1	normal
DMD	21	49-52	146	188	249	1563,3	78,4	difuso
DMD	20	45-47	42	40	26	502,7	95,0	Inespecifico verde-vermelho
DMD	20	51-52	46	69	69	578,5	89,6	normal
DMD	18	48-51	84	84	129	739,0	85,5	normal
DMD	19	50	51	63	81	711,0	65,7	normal
DMD	13	48-52	26	52	82	647,5	119,1	normal
DMD	14	43-45	81	70	132	629,2	46,0	normal
DMD	14	51	39	33	67	384,1	75,7	normal
DMD	13	47	64	60	89	405,8	88,3	normal
DMD	13	48-50	82	79	84	711,0	69,7	normal
DMD	10	47-52	164	125	167	1708,0	66,9	protanomalo
DMD	12	3a60	111	81	170	7795,1	69,1	protanomalo
DMD	16	43	122	73	154	1432,8	53,5	protanomalo

Tabela 3 (continua ção): Características dos sujeitos com Distrofia Muscular de Duchenne

Diagnóstico	Idade	Deleção	Trivector			Área Elipse	Ângulo Elipse	Classif. CCT
			Protan	Deutan	Tritan			
DMD	21	8	56	69	109	437,2	75,0	normal
DMD	20	7	49	62	88	608,4	60,3	normal
DMD	10	5a13	97	98	130	793,6	178,7	normal
DMD	17	8a27	39	65	58	169,8	67,6	normal
DMD	17	8a9	46	46	75	569,7	72,6	normal
DMD	23	3a7	176	470	64	1,45E+13	159,6	deuteranopia
DMD	10	11a15	69	54	97	587,1	70,1	normal
<hr/>								
DMD	18	não	114	93	145	1565,5	69,6	difuso
DMD	17	não	127	130	342	958,5	12,9	protanomalo
DMD	20	não	72	58	122	834,1	70,1	normal
DMD	8	não	149	150	151	3050,9	78,7	Inespecifico verde-vermelho
DMD	10	não	82	86	79	810,1	24,8	protanomalo
DMD	19	não	53	36	67	254,5	131,6	deuteranomalo
DMD	13	não	112	64	150	1661,1	63,4	normal
DMD	13	não	39	44	45	339,5	47,2	normal
DMD	15	não	111	81	175	1263,2	71,1	difuso
DMD	15	não	95	91	126	646,1	20,7	protanomalo
DMD	18	não	100	26	91	497,3	83,0	difuso
DMD	11	não	84	45	93	677,5	87,0	normal
DMD	14	não	116	105	89	1508,0	68,9	difuso
DMD	10	não	63	53	48	582,2	68,0	normal
DMD	12	não	107	120	113	1639,8	179,9	deuteranomalo
DMD	18	não	47	46	42	206,5	170,2	deuteranomalo
DMD	19	não	90	60	98	470,1	67,5	normal
DMD	9	não	142	120	146	950,3	81,9	protanomalo
DMD	9	não	265	200	240	2600,0	96,9	normal
DMD	9	não	74	100	99	1099,3	101,8	normal

Tabela 3 (continuação): Características dos sujeitos do grupo controle

Diagnóstico	Idade	Trivector			Área Elipse	Ângulo	Classif. CCT
		Protan	Deutan	Tritan			
Normas	17	39	30	57	231,5	71,3	normal
Normas	18	33	23	60	238,9	50,7	normal
Normas	18	33	33	40	224,4	79,3	normal
Normas	16	46	49	63	279,6	86,2	normal
Normas	17	29	26	60	185,9	67,6	normal
Normas	18	40	33	48	265,3	78,3	normal
Normas	23	33	40	57	303,3	80,5	normal
Normas	21	46	46	52	347,1	94,0	normal
Normas	20	44	29	47	240,2	64,1	normal
Normas	18	26	29	45	265,1	91,9	normal
Normas	17	35	29	29	190,7	90,2	normal
Normas	18	29	30	44	299,3	92,1	normal
Normas	17	46	47	47	244,5	90,0	normal
Normas	19	36	36	39	279,5	86,7	normal
Normas	18	43	29	55	262,4	59,8	normal
Normas	17	54	58	50	876,1	65,1	normal
Normas	20	62	62	86	566,7	65,9	normal
Normas	11	49	61	70	437,1	63,6	normal
Normas	10	71	47	77	673,5	97,6	normal
Normas	11	69	61	102	618,3	62,4	normal
Normas	10	94	85	102	684,6	94,8	normal
Normas	12	59	62	72	205,4	83,4	normal
Normas	11	76	81	71	381,8	75,6	normal
Normas	10	76	70	98	191,9	95,7	normal
Normas	12	72	80	66	191,4	90,1	normal
Normas	12	78	65	96	226,2	82,1	normal



Figura 9: simulação da situação de exame do teste de visão de cores de Cambridge (CCT). Ao fundo, o monitor apresentando o estímulo “C” cromático e o ruído de luminância. Nas mãos do sujeito, a caixa de respostas, com os botões nas respectivas quatro direções em que pode aparecer a abertura da letra “C”: inferior, superior, direita, esquerda. Durante o exame, conforme a resposta do sujeito, a direção da abertura do “C” e a sua saturação, com relação à cor do fundo mudam.

apertava um dos quatro botões da caixa de resposta (CT3 - Cambridge Research Instruments, Rochester, UK), correspondente à direção da abertura da letra “C” (figura 9). Em sujeitos com impedimento motor que os impossibilitassem de apertar os botões, o examinador apertava os botões, mediante resposta verbal do sujeito. A vantagem do controle computadorizado é que a diferença de cromaticidade entre o fundo e o alvo pode ser dinamicamente ajustada, de acordo com a performance do sujeito.

No início da testagem, a mira apresenta uma cor saturada e, utilizando a metodologia psicofísica da escada, se obtém o limiar entre as cromaticidades da mira e do fundo, ou seja, a diferença mínima entre as cromaticidades necessária para que o sujeito possa informar a orientação da letra “C”.

O CCT apresenta duas possibilidades de testagem. Uma versão reduzida chamada de Trivector, onde a mira difere do fundo percorrendo três linhas teoricamente significantes dentro do espaço de cor, ou seja, as linhas de confusão protan, deutan e tritan, testando respectivamente, os cones para comprimentos de onda longo, médio e curto. A apresentação é aleatória, ocorre simultaneamente nestas 3 linhas e periodicamente, uma mira controle é apresentada para garantir que o sujeito encontra-se alerta e não está tentando responder errado propositalmente.

A versão longa do teste possibilita a construção de uma elipse de discriminação (elipse de MacAdam – medida por equiparação do limiar de sensibilidade cromático para diferentes cores realizado por Dr. David MacAdam nos anos 40, descrita como elipses no diagrama de cromaticidade). Nesta versão, utilizamos 8 vetores para a construção da elipse em torno do mesmo ponto do espaço de cores utilizado como fundo para o Trivector. Os vetores são escolhidos aleatoriamente 2 a 2, pelo programa gerador dos

estímulos. Após a detecção do limiar em cada vetor, a elipse é traçada utilizando-se o método dos mínimos quadrados (solução geométrica para a produção da elipse pela minimização da soma dos quadrados das distâncias, em logaritmo, entre a elipse e o ponto encontrado nos vetores).

Tal elipse é capaz de mostrar a perda de sensibilidade em uma variedade de direções ao redor da cromaticidade do fundo. O ângulo do maior eixo da elipse em associação com a relação entre os eixos foi utilizado como o indicativo do tipo de perda (protan, deutan, tritan ou difuso - defeito acometendo os 3 eixos principais no Trivector e não apresentando ângulo específico na elipse) e o valor da área, utilizado como um indicador do nível de prejuízo. Quanto maior a área, pior a discriminação do sujeito (Regan *et al.*, 1994).

Além dos defeitos acima citados podemos ainda classificar o defeito como inespecífico - para protan-deutan ou tritan-tetartan - quando há alterações evidentes na discriminação cromática nos respectivos eixos, porém, sem uma concordância quanto ao tipo de defeito. Isto ocorre quando o Trivector aponta para um tipo de defeito (por exemplo, deutan) e os parâmetros da elipse para outro (por exemplo, protan).

Pelo fato do teste utilizar a letra “C” ao invés de caracteres alfanuméricos, além de evitar a memorização para testagens posteriores, torna o teste cognitivamente simples permitindo ao sujeito entender a tarefa a ser cumprida com relativa facilidade. Recentes estudos têm demonstrado uma vantagem dos testes computadorizados sobre os testes semi-quantitativos, classicamente utilizados na avaliação da visão de cores, como o teste de Farnsworth-Munsell 100-Hue. Aparentemente, o teste de cores de Cambridge permite uma análise mais precisa das vias visuais envolvidas no processamento cromático -

parvocelular e koniocelular (Castelo-Branco, Faria, Forjaz, Kozak, & Azevedo, 2004, Ventura *et al.*, 2003a, Ventura *et al.*, 2003b).

III.3.3. Sujeitos e Equipamento: Anomaloscópio de Neitz

Os sujeitos foram submetidos ao Anomaloscópio I de Neitz (Neitz Instruments Co., Ltd, Tokyo, Japan, model: OT-II) (Figura 10), teste padrão ouro para o diagnóstico de defeitos na visão de cores para o eixo verde-vermelho – defeitos protanópicos e deuteranópicos (Pokorny *et al.*, 1981), comparados com um filtro em 589nm.

Este equipamento permite a obtenção da equação de Rayleigh. Esta equação nos possibilita diferenciar tricromatas normais de sujeitos com defeitos de cor para verde-vermelho e a sua classificação. A equação Rayleigh é uma equiparação de cor que envolve uma mistura de luz de dois filtros, um de pico espectral em 545nm e um em 670nm (Siegel, 1981).

Dois dados são extraídos desta mistura: a amplitude e o ponto médio da equiparação. A amplitude inclui todas as proporções de 545nm e 670nm para o sujeito que podem ser equiparadas ao 589nm. Normalmente, poucas modificações podem ser realizadas na proporção da mistura sem alterar a percepção da equiparação (Pokorny *et al.*, 1981).

III.3.4. Protocolo de Testagem

O procedimento experimental do Anomaloscópio de Neitz (Pokorny *et al.*, 1981) consiste na observação de um campo circular bipartido verticalmente de 2° de ângulo visual. No hemicampo inferior temos um filtro amarelo com uma estreita faixa espectral centrada em 589nm, que pode variar em luminância de escuro até amarelo brilhante. No



Figura 10: figura ilustrando o Anomaloscópio de Neitz OT-II, utilizado para a classificação da visão de cores dos sujeitos com DMD. Na perspectiva da foto superior tem-se a ocular telescópica na parte superior do aparelho por onde o sujeito olha para observar o campo bipartido. O círculo branco na parte inferior do aparelho é o campo de adaptação – iluminante A. Na foto inferior, tem-se a visão lateral onde é possível se ver os botões utilizados para os ajustes: botão superior – ajuste da proporção dos filtros verde-vermelho; botão inferior – luminância do filtro amarelo. Os valores respectivos da proporção e da luminância são monitorados pelos visores digitais existentes na lateral do equipamento.

hemicampo superior, temos dois filtros de igual luminância: um verde (545nm) e um vermelho (670nm) que, quando sobrepostos, emitem uma luz amarela. Quando ambos os campos são pareados em cromaticidade, a luminância do campo é de aproximadamente 5 cd.m⁻². O exame foi realizado em sala escura.

A luminância do campo amarelo pode variar em um contínuo ao se girar o botão inferior localizado na lateral direita do equipamento. Quando este botão é ajustado, a luminância do amarelo varia de escuro total (valor 0 unidades da escala) até amarelo brilhante (87 unidades da escala). A metade superior do campo é preenchida com uma mistura dos filtros verde e vermelho acima descritos e suas proporções relativas também podem ser ajustadas pelo botão superior. Com valor da escala em zero unidade, o campo aparece verde, pois apenas o filtro verde está presente. Conforme o botão é ajustado continuamente para valores mais altos há um aumento na proporção de vermelho adicionado ao verde variando a aparência para verde-amarelado, amarelo, laranja e ao final da escala (73 unidades) vermelho, uma vez que neste ponto somente o filtro vermelho está presente.

Antes de ser submetido ao exame, o sujeito observava por 3 minutos um campo de adaptação uniforme (Iluminante A – lâmpada incandescente com temperatura de cor de 2586°K). Em seguida, a luz de adaptação era desligada e o sujeito orientado a observar dentro de um tubo telescópico, o campo circular. Como sujeitos normais apresentam uma boa equiparação cromática entre os hemicampos quando o inferior apresenta um valor de 15 unidades e o superior de 45 unidades (Pokorny *et al.*, 1981) apresentamos estes valores e perguntamos ao sujeitos em teste, se as cores dos campos superior e inferior eram iguais ou diferentes.

Sujeitos normais e dicromatas diziam que as cores eram iguais ou praticamente iguais. Tricromatas anômalos diziam que o campo superior parece ser mais avermelhado (deuteranômalos) ou esverdeado (protanômalos), dependendo do defeito que apresentam. Neste ponto, permitimos aos sujeitos ajustar o botão superior para uma equiparação precisa.

Para os sujeitos normais, o próximo passo era avaliar a amplitude de equiparação aceitável para misturas de verde-vermelho, que apresenta uma faixa muito estreita em sujeitos normais, variando de 0 a 5 unidades da escala. Então, valores superiores e inferiores foram alternadamente apresentados em até 5 unidades da escala do valor de equiparação inicial. O experimentador ajustava o valor em passos de uma unidade e perguntava ao sujeito: “Os campos são iguais ou diferentes?”, podendo ser realizados pequenos ajustes no botão inferior pelo sujeito. Entre cada apresentação, sujeito fixava por alguns segundos o campo de adaptação para evitar a adaptação cromática local.

Para os dicromatas e tricromatas anômalos, grandes amplitudes de equiparações podem ocorrer, excedendo o valor de até 5 unidades esperado para os normais. Neste caso, após a realização dos procedimentos anteriores, o examinador ajustava o valor do botão superior para 0 (somente filtro verde) e pedia ao sujeito que ajustasse o botão inferior para se obter a equiparação. Conseguindo ou não, avançava-se de 10 em 10 unidades até que toda a escala seja percorrida. Deuteranopes realizavam pequenos ajustes no botão inferior, permanecendo próximo ao valor de 15 para toda a escala. Protanopes ajustavam o botão inferior em valores altos (35-40) para valor 0 e valores muito pequenos (0 a 5) para o valor 73 da escala superior.

De acordo com a amplitude de equiparação podemos, então, classificar a discriminação cromática dos sujeitos. Em geral, os tricromatas normais apresentam uma distribuição de equiparação que descreve uma curva normal e tem, em sua maioria, um único ponto de equiparação com um desvio padrão muito pequeno. Além destes, existem outras duas classes de sujeitos com visão de cores normal: os tricromatas com visão de cores *desviante*, que apresentam o ponto de equiparação dentro da amplitude normal mas deslocado mais de 2 desvios padrão do ponto médio dos normais; tricromatas com uma visão de cores classificada como *pobre*, uma vez que apresentam o ponto médio da equiparação dentro da faixa normal mas a amplitude desta é maior do que duas vezes a frequência observada para a população. Segundo Pokorny *et al.*, (1981), 4% da população apresenta uma visão de cores *desviante* e, aproximadamente 20% têm uma visão de cores *pobre*.

Após a administração do teste, o ponto médio e a amplitude de equiparação foram calculados e convertidos no Quociente Anômalo (Q.A.), pela fórmula:

$$\text{Quantidade } 545\text{nm}/670\text{nm} \text{ do sujeito} \div \text{Quantidade } 545\text{nm}/670\text{nm} \text{ dos controles}$$

Para tricromatas normais, o Q.A. varia de 0,8 a 1,2 (Pokorny *et al.*, 1981). Segundo estes autores, a vantagem de se utilizar o Q.A., em vez da simples descrição do ponto médio e da amplitude é que, desta forma, pode-se utilizar o Q.A. para a comparação de dados entre diferentes laboratórios, se os mesmos filtros são utilizados. Para nossas comparações utilizamos os valores de Q.A. acima citados como valores de normalidade, obtidos em um grande estudo populacional com, aproximadamente, 1200

pessoas com idade entre 21 e 22 anos, mas também expressamos o ponto médio e a amplitude do ajuste que é utilizado para a quantificação e qualificação do defeito, já que o ponto médio se apresenta deslocado apenas para os defeitos de visão de cores leves (tabela 3).

III.3.5. Sujeitos e Equipamento: Ishihara e AO-HRR

Outros dois testes de pranchas, os mesmos utilizados nos estudos genéticos mencionados anteriormente, foram utilizados para a detecção e classificação dos defeitos da visão de cores: Ishihara Test for Color Blindness (24 plates edition, Kanehara & Co., Ltd, Tokyo, Japan) e AO H-R-R Pseudoisochromatic Plates (American Optical Hardy-Rand-Rittler, Richmond Products Inc., Boca Raton, Florida, USA). Estes testes consistem de uma série de pranchas nos quais pequenos círculos coloridos de vários tamanhos são impressos para formar uma figura multicolorida a qual é observada contra um fundo também multicolorido.

Sendo assim, a única diferença sistemática entre a figura e o fundo é a cor: a figura é composta por círculos de uma ou mais cores e o fundo é composto por círculos de cores diferentes. Sujeitos normais podem detectar as diferenças de matizes entre a figura e o fundo, enquanto que sujeitos com defeitos na visão de cor falham em distinguir a figura do fundo. Assim, a figura aparece isocromática – de mesma cor - para estes sujeitos.

O teste AO H-R-R foi confeccionado para a detecção e classificação de defeitos para verde-vermelho e azul-amarelo e para estimar o grau de defeito. Este teste é composto de 24 pranchas nos quais círculos coloridos de vários tamanhos e luminâncias

formam símbolos em um fundo de círculos cinza de vários tamanhos e luminâncias. Estes símbolos são: uma cruz, um círculo e um triângulo.

Assim como o AO H-R-R, o teste de Ishihara também foi confeccionado para possibilitar a detecção e classificação de defeitos de visão de cores. Todavia, o teste de Ishihara apenas detecta defeitos para o eixo de confusão verde-vermelho. Se por um lado este teste só detecta defeitos protan-deutan, por outro lado ele possibilita uma diferenciação entre os dois tipos de defeitos deste eixo: protanomalias e deuteranomalias.

O teste consiste de pranchas com um ou dois dígitos (aproximadamente 2/3 do número de cartões) e trilhas que podem ser traçadas com uma vareta de plástico (1/3 do número de pranchas). Estas últimas pranchas são utilizadas para pessoas iletradas. A prancha inicial é utilizada para demonstração e contém 2 dígitos que podem variar de acordo com a edição. Estes dois dígitos são formados por pequenos círculos coloridos que diferem de um fundo também formado por pequenos círculos de cor diferente. Sujeitos com acuidade igual ou superior a 20/200 podem realizar este teste.

O número de pranchas pode variar de acordo com a edição: 38, 16 ou 24 pranchas, a qual foi utilizada neste estudo. Nesta edição, a primeira prancha é de demonstração, as pranchas de 2 a 15 são para a detecção, as pranchas 16 e 17 para a diferenciação entre defeitos protan e deutan e, as pranchas de 18 a 24 para os iletrados.

III.3.6. Protocolo de Testagem

No AO H-R-R, as primeiras 4 pranchas são de demonstração, utilizados para treino: 3 têm símbolos e um não. Sujeitos com acuidade visual melhor ou igual a 20/200 são capazes de realizar o teste. Durante a apresentação o sujeito deve informar qual(is)

figura(s) ele(a) está enxergando. Estas pranchas de demonstração são seguidas por outras 6 (quatro para defeitos verde-vermelho e duas para defeitos azul-amarelo). O sujeito que responder corretamente a estas 6 pranchas tem visão de cores normal e o teste termina. Se o sujeito erra pelo menos um das duas primeiras pranchas o examinador pula as pranchas para os de número 17 a 20, que são as pranchas que detectam defeitos no eixo azul-amarelo. Por outro lado, se o sujeito erra pelo menos uma das pranchas de número 3 a 6 o examinador continua a avaliação das pranchas 7 a 16, os quais detectam defeitos no eixo verde-vermelho.

No teste Ishihara, os sujeitos eram instruídos a ler os números em 5 segundos. Esta foi uma ligeira adaptação que realizamos pelas características da população que estudamos pois, o teste convencional pede que a leitura seja feita em 3 segundos. O livro foi segurado a 75cm do sujeitos próximos a uma janela para se obter a condição de luz do dia. Todos os sujeitos foram testados no mesmo período do dia.

Para a edição que utilizamos, até dois erros são considerados aceitáveis para um sujeito normal. Seis erros ou mais detecta defeito na visão de cores. Três a 5 erros exigem reteste.

III.4. Metodologia do Eletrorretinograma

III.4.1. Sujeitos e Equipamento

A avaliação do eletrorretinograma foi realizada em 10 sujeitos com DMD seguindo as normas da Sociedade Internacional para Eletrofisiologia Clínica da Visão (ISCEV - *sigla em inglês*) (Marmor, Holder, Seeliger, & Yamamoto, 2003) (tabela 4). O protocolo de testagem foi iniciado após a dilatação da pupila com 1 gota de colírio de cloreto de fenilefrina 2,5% (Oculum) associada a 1 gota de colírio de tropicamida 1%

Tabela 4: Característica amostra dos sujeitos que realizaram o ERG de campo total.

Grupo	Idade	del e ção	AV	Escotópica				Resposta Máxima			
				amp-a	amp-b	lat-a	lat-b	amp-a	amp-b	lat-a	lat-b
DMD											
dele ção down30	19	47-52	20/20	-14,06	55,86	63,2	128,8	-94,72	43,52	20,8	112
	15	50	20/20	-6,66	44,68	44,8	126,4	-68,02	91,95	15,2	94,4
	13	47-50	20/20	-24,71	84,67	50,4	124,8	-267,07	231,67	20,8	129,6
Del e ção up30											
21	8	20/20	-3,38	173,39	29,6	88	-191,04	338,68	19,2	52	
20	7	20/20	-6,37	19,32	24	93,6	-199,49	79,37	21,6	33,6	
Sem del e ção											
15		20/20	-0,52	133,32	36	98,37	-169,35	239,67	20,8	57,6	
18		20/20	-64,74	111,28	39,2	100,8	-64,42	35,49	6,4	13,6	
19		20/20	-9,96	103,9	35,2	88	-133,22	245,31	20	58,4	
14		20/20	-1,52	18,75	58,4	116,8	-113,69	68,04	23,2	36	
17		20/20	-9,37	161,48	29,6	94,4	-168,77	191,21	20,8	52,8	
Controles											
18		20/20	-14,24	263,92	36	88,8	-26,29	131,84	20,00	40,00	
22		20/20	-0,7	115,18	26,4	84	-153,61	266,12	20,00	40,80	
17		20/20	-3,7	218,55	28,8	94,4	-254,82	580,78	20,80	94,40	
18		20/20	-3,05	219,55	25,6	90,4	-189,35	421,63	20,00	40,00	
18		20/20	-5,33	175,08	36	97,6	-226,04	386,12	20,00	52,00	
19		20/20	-7,77	220,32	33,6	80	-182,70	347,04	20,00	58,40	
18		20/20	-6,46	191,19	26,4	77,6	-246,17	444,09	19,20	52,00	
18		20/20	-2,35	126,58	22,4	91,2	-142,06	248,8	20	39,2	
19		20/20	-6,46	248,56	37,6	102,4	-54,68	80,08	19,20	43,20	
18		20/20	-2,07	105,41	38,4	90,4	-134,49	231,6	20,00	46,40	
20		20/20	-5,02	148,26	33,6	97,6	-143,63	221,32	20,80	46,40	
19		20/20	-6,54	244,14	26,4	77,6	-237,29	434,37	19,20	47,20	
18		20/20	-9,18	247,7	31,2	68,8	-230,26	431,22	20,80	47,20	

Potenciais Oscilatórios

	amp PO 1	a mp PO 2	a mp PO 3	a mp PO 4	lat PO1	lat PO2	lat PO3	lat PO4
7,53	15,07	3,89	13,59	19,2	25,6	28,8	32	32
1,59	2,63	13,35	8,67	11,2	15,2	16,8	18,4	18,4
5,83	13,21	24,42	12,67	12	16	23,2	30,4	30,4
5,79	12,94	57,91	34,6	10,4	15,2	21,6	29,6	29,6
3,19	13,46	13,47	7,47	9,6	18,4	25,6	31,2	31,2
10,25	14,9	49,27	27,73	12,8	16,8	23,2	29,6	29,6
5,61	23,17	17,64	21,45	13,6	17,6	21,6	27,2	27,2
7,18	10,4	40,26	23,12	12	16	22,4	29,6	29,6
6,72	11,19	15,57	6,96	13,6	16	26,4	32	32
6,19	12,17	30,35	10,3	11,2	16,8	23,2	30,4	30,4
5,13	12,84	54,05	40,62	12,8	16	21,6	28	28
8,18	11,13	42,92	35,47	12	16	22,4	29,6	29,6
8,23	17,82	62,84	37,04	11,2	16,8	22,4	30,4	30,4
5,2	14,68	61,91	43,5	10,4	16,8	22,4	30,4	30,4
6,11	14,67	35,49	31,32	11,2	16,8	22,4	28	28
4,78	8,93	31,7	25,94	10,4	16	19,2	28,8	28,8
4,59	11,64	39,89	27,74	11,2	16	21,6	29,6	29,6
2,38	6,08	30,83	19,97	12	16	22,4	28,8	28,8
5,14	4,04	16,39	13,02	14,4	17,6	23,2	30,4	30,4
8,81	20,85	53,05	43,67	12	16	21,6	28,8	28,8
12,68	18,73	58,98	56,73	12	16	21,6	27,2	27,2
6,30	12,10	44,20	34,10	11,10	16,00	22,20	30,10	30,10
7,10	11,30	41,60	33,90	11,00	15,90	21,30	29,4	29,4

Flicker 30Hz						Cones adaptados à luz					
amp-a	amp-b	lat-a	lat-b	amp-a	lat-a	amp-b	lat-b	amp-a	lat-a	amp-b	lat-b
-48,44	54,6	31,2	33,6	9,63	14,4	28,58	14,4	24,8	24,8	24,8	24,8
-15,74	43,19	14,4	32	13,96	2,22	24,8	16	16	16	16	16
-93,82	84,95	16,8	28	-59,44	8,41	20,8	26,4	26,4	26,4	26,4	26,4
-5,64	15,96	6,4	24,8	-20,88	87,69	12,8	24,8	24,8	24,8	24,8	24,8
-52,24	57,58	16	36,8	-33,34	83,54	23,2	28,8	28,8	28,8	28,8	28,8
-72,12	93,49	12	24,8	-33,73	108,14	13,6	26,4	26,4	26,4	26,4	26,4
-55,92	40,69	6,4	14,4	-115,27	124,85	8	13,6	13,6	13,6	13,6	13,6
-68,91	70,51	13,6	27,2	-29,28	100,48	13,6	28	28	28	28	28
-58,02	75,23	15,2	28,8	-40,87	96,02	21,6	27,2	27,2	27,2	27,2	27,2
-79,69	102,69	16	31,2	-25,8	119,88	15,2	26,4	26,4	26,4	26,4	26,4
-44,88	67,6	13,6	25,6	-26,37	103,03	20,8	24,8	24,8	24,8	24,8	24,8
-31,94	61,18	9,6	24,8	-19,55	99,29	12	26,4	26,4	26,4	26,4	26,4
-84,22	92,71	13,6	26,4	-26,54	127,61	14,4	26,04	26,04	26,04	26,04	26,04
-46,71	73,24	12,8	25,6	-23,32	99,49	13,6	26,4	26,4	26,4	26,4	26,4
-75,56	86,2	15,2	32,8	-36,34	386,36	19,6	28,8	28,8	28,8	28,8	28,8
-19,73	23,04	13,6	28	-22,59	66,02	14,4	26,4	26,4	26,4	26,4	26,4
-57,23	58,44	13,6	33,6	-20,66	68,24	13,6	29,6	29,6	29,6	29,6	29,6
-46,61	59,97	14,4	27,2	-23,3	61,69	12,8	26,4	26,4	26,4	26,4	26,4
-53,31	66,03	16,8	32,8	-19,16	82,66	13,6	27,2	27,2	27,2	27,2	27,2
-40,01	49,52	13,6	26,4	-26,77	96,9	12,8	27,2	27,2	27,2	27,2	27,2
-27,69	31,24	14,4	28	-17,35	72,77	12,8	27,2	27,2	27,2	27,2	27,2
-68,67	72,87	13,6	29,6	-16,07	52,51	15,2	28	28	28	28	28
-83,46	116,92	11,2	24,8	-30,43	131,79	12	26,4	26,4	26,4	26,4	26,4

(Alcon) e adaptação ao escuro com oclusão total do olho por 30 minutos. Os ERGs foram registrados utilizando-se um eletrodo de lente de contato bipolar com filamento de ouro (Goldlens, Doran Instruments, USA) (figura 11) no mesmo olho em que se realizou a avaliação da visão de cores. O olho do sujeito foi anestesiado (cloridrato de tetracaína em solução oftálmica, Alcon) para que não houvesse nenhum desconforto por parte do paciente. Uma vez que a lente apresenta uma borda de material isolante que funciona como um blefarostato, impedindo o sujeito de piscar, ela foi preenchida com uma solução de metilcelulose a 2% (Ophthalmus) que melhora a condutibilidade elétrica e protege a córnea evitando o seu ressecamento e edema secundário durante todo o período de exame.

Após completada a etapa de dilatação das pupilas, o sujeito era sentado confortavelmente em uma cadeira posicionada em frente ao Ganzfeld (LKC Technologies; mod. 2503SH) com a sala completamente escura e a lente era posicionada em seu olho. O sujeito, então, era orientado a apoiar seu mento e sua frente nos respectivos locais, evitar ao máximo se movimentar e a tentativa de piscar, e caso ocorresse qualquer problema durante o exame, comunicar ao examinador para que este fosse interrompido.

Os estímulos foram flashes de luz produzidos por um fotoestimulador (Grass Instruments; mod. PS33-plus) em duas intensidades: 2 para a estimulação dos bastonetes e 8 para a estimulação dos cones, que eram apresentadas no Ganzfeld (figura 11).



Figura 11: Ilustração dos equipamentos utilizados para a medida do eletrorretinograma de campo total. Na foto superior, à direita, uma visão geral do computador utilizado para o registro das respostas e análise dos dados (esquerda), seqüência de amplificador e estimulador (centro) e a cúpula refletora – Ganzfeld (direita). Nas fotos inferiores, à direita, temos em aumento e com visão frontal o Ganzfeld (esquerda) e a estação contendo o controlador do Ganzfeld (acima), o amplificador com botões para filtragem do sinal (centro) e o fotoestimulador (abaixo). À esquerda temos a visão frontal e lateral da lente-eletrodo utilizada para a captação das respostas retinianas.

III.4.2. Protocolo de Testagem

Utilizamos o protocolo da ISCEV, medindo na seguinte seqüência: resposta de bastonetes, resposta máxima com o olho adaptado ao escuro, potenciais oscilatórios, resposta a estímulos de piscar intermitente (flicker) a 30Hz e resposta de cones adaptados à luz. A ISCEV sugere que a resposta de flicker seja realizada sob condições fotópticas para um maior conforto do paciente, porém, nós realizamos a medida na condição escotóptica, uma vez que frequência de estimulação (30Hz) está acima da taxa temporal de resposta dos bastonetes. Não foram utilizados filtros coloridos para as respectivas medidas. As respostas do ERG foram amplificadas por um pré-amplificador AC (Grass Instruments, mod. CP511). Os dados foram armazenados e analisados em um microcomputador PC após serem digitalizados por uma placa da National Instruments.

A resposta dos bastonetes foi baseada na média de respostas para 20 flashes apresentados a intervalos de 2 segundos (s) com uma atenuação de 2,5 unidades logarítmicas para o flash na intensidade máxima ($0,009 \text{ cd.m}^{-2}$). A resposta máxima foi obtida com o flash na intensidade máxima (2.8 cd.m^{-2}), repetindo-se o mesmo procedimento utilizado para a resposta dos bastonetes, exceto pelo intervalo entre estímulos que foi de 10s. Esta estimulação resulta em uma resposta combinada de cones e bastonetes.

Potenciais oscilatórios foram isolados pela utilização de um filtro *passa-alto* existente no próprio amplificador. Repetiu-se o procedimento e os parâmetros de flash utilizados para a resposta máxima. Para a análise da soma dos POs, realizamos a somatória das amplitudes pico-a-pico de todos os POs individuais. Para a análise isolada

de cada PO, realizamos a medida da amplitude pico-a-pico e a medida da latência para a ocorrência do pico positivo.

A resposta ao estímulo de flicker 30Hz foi medida pela média de 50 respostas ao estímulo de luz na intensidade máxima, apresentado a 30Hz. E por fim, a resposta dos cones adaptados ao claro foi medida, após 10 minutos de exposição a uma luz de fundo de 32 cd.m^{-2} , pela média de 20 respostas obtidas em intervalos de 10s.

Os parâmetros do ERG medidos foram: amplitude da onda-a e a amplitude pico-a-pico que expressa a diferença entre a onda-a negativa e a onda-b positiva, em microvolts (μV), e o tempo implícito que expressa a latência do tempo de aparecimento dos picos das ondas a e b, após ser dado o estímulo, em milisegundos (ms). Também analisamos a amplitude da soma dos potenciais oscilatórios e de cada um isoladamente, além das latências de cada potencial individualmente (figura 12).

Seguindo as normas de análise sugerida pela ISCEV (Marmor *et al.*, 2003), utilizamos como valores de normalidade a mediana e como limites de normalidade, os valores que excedem os 95% da mediana. Em outras palavras, o limite de confiança de 95% determinado pela tabulação direta dos dados. Esta forma de análise se deve ao fato de que a maioria dos parâmetros analisados no ERG não é necessariamente, normalmente distribuído, como por exemplo, a amplitude da onda-b. Então, cálculos de medidas de dispersão, como o desvio padrão, podem nos levar a conclusões equivocadas.

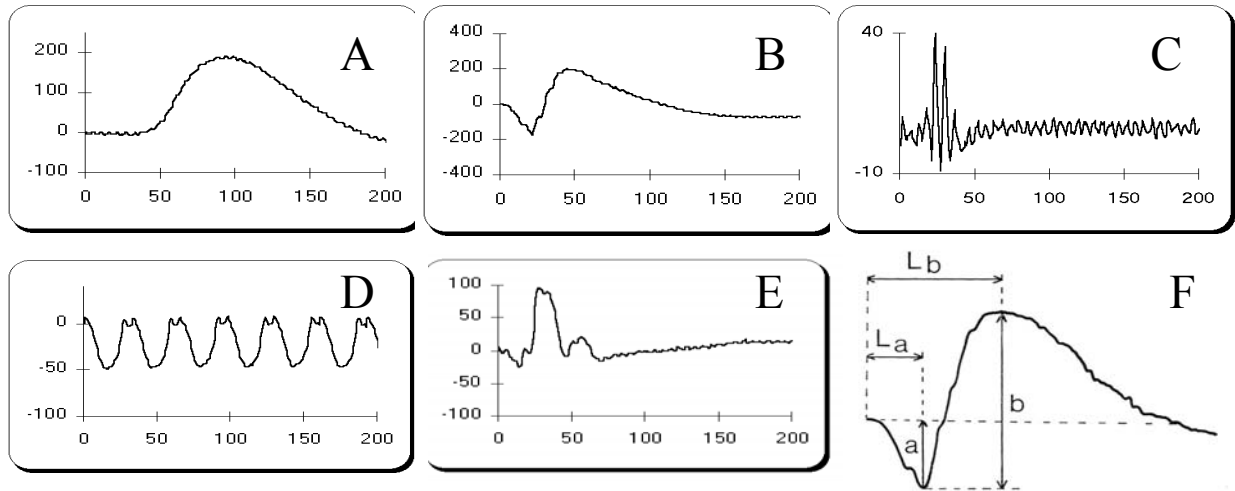


Figura 12: figura mostrando exemplos das cinco tipos de respostas medidas no eletrorretinograma (ERG), pertencentes ao protocolo da ISCEV (International Society for Clinical Electrophysiology of Vision). Este protocolo consiste da avaliação da resposta retiniana a estímulos escotópicos, mediado por bastonetes (A), em seguida, registra-se a resposta máxima onde cones e bastonetes respondem ao estímulo (B). Em C, temos a filtragem dos potenciais oscilatórios que ocorrem no ramo ascendente da onda-b da resposta máxima. As respostas mediadas por cones são obtidas por estimulação em alta frequência temporal (30Hz) e após adaptação à luz por 10 minutos (C e D, respectivamente). Para cada um destes parâmetros do ERG, avaliamos a amplitude máxima das respostas da onda-a e da onda-b (“a” e “b” em F) e o tempo de ocorrência desta, ou seja, sua latência (“ L_a ” e “ L_b ” em F).

III.5. Metodologia da Sensibilidade ao Contraste de Luminância

III.5.1. Sujeitos e Equipamento: Contraste Espacial

A sensibilidade ao contraste espacial e temporal de luminância foram medidas psicofisicamente utilizando o software PSYCHO for Windows v 2.36 (Cambridge Research Systems – CRS-Ltd). As características desta amostra estão na tabela 5. Os estímulos foram apresentados em um monitor Sony Trinitron 19 polegadas (GFD-420), comandado por uma placa gráfica Cambridge Research VSG 2/4, com uma frequência de varredura de 100 Hertz e uma resolução de 800 x 600 pontos por polegadas (dpi). O grupo controle para este teste foi composto por 17 sujeitos com idade pareada.

III.5.2. Protocolo de Testagem

Para a medida da sensibilidade ao contraste espacial, os estímulos utilizados foram grades de ondas senoidais nas frequências espaciais de 0,5; 1,0; 2,0; 5,3; 9,7 e 19,4 ciclos por grau (cpg), que apresentavam uma luminância média de 34.4 cd/m^2 , medida pelo fotômetro Optical OP200-E (Cambridge Research Systems – CRS-Ltd) subtendendo uma área de 4° de ângulo visual. Para determinarmos a função de sensibilidade ao contraste utilizamos o método psicofísico do ajuste.

Em tal metodologia, o examinador controlava uma caixa de respostas (CB3 – CRS-Ltd) que continha 2 botões funcionais: um deles era utilizado para se ajustar o nível do contraste; o outro para registrar a resposta. No início da testagem, as ondas senoidais apresentavam contraste máximo (figura 13). O examinador, então reduzia o nível de contraste que pode variar de 100% a 0%, progressivamente em passos de 1%, até o ponto no qual o sujeito referisse não estar mais sendo capaz de discriminar o estímulo do fundo

Tabela 5: Característica dos sujeitos no teste de sensibilidade ao contraste de luminância

Idade	Deleção	SC Luminância						SC Cromático Temporal					
		0,5	1,0	1,9	5,3	9,7	19,4	1,0	2,0	10,0	20,0	33,0	
9	47-52	13,5	8,7	16,1	16,0	6,3	2,8						
9	48-52	13,1	14,1	17,0	10,6	4,4	4,6						
15	50	14,5	34,5	35,8	54,6	12,5	7,3						
15	47-48	18,0	16,4	11,3	25,8	11,3	3,4						
12	50	39,8	75,2	39,8	52,8	14,9	10,0						
12	50	12,6	33,9	23,1	14,9	4,4	3,2						
13	47-50	17,4	45,6	59,9	43,0	18,1	3,6						
8	50	59,2	66,0	102,0	76,2	38,4	12,7						
9	45	21,2	57,0	120,0	76,3	38,7	14,4						
16	49-50	61,6	63,0	43,4	10,8	2,7	2,2						
9	43	4,4	11,5	10,6	8,4	5,1	2,5						
9	47-52	18,6	41,3	59,7	155,0	27,9	6,1						
18	46-55	11,2	32,7	13,3	11,2	3,1	1,1						
13	51	30,2	34,3	41,0	29,8	9,5	2,8						
21	49-52	10,7	12,2	21,6	15,0	5,5	2,1						
20	45-47	30,5	74,3	101,0	100,0	26,1	7,1						
20	51-52	34,7	58,0	66,3	30,5	5,4	2,9						
18	48-51	19,9	71,2	115,0	127,0	36,8	20,0	4,8	13,7	19,9	10,3	1,9	
19	50	29,8	74,0	87,2	84,2	30,3	5,5	6,2	17,0	32,7	16,0	4,7	
13	48-52	14,6	32,1	11,3	7,5	2,6	1,1	14,9	24,4	19,6	20,0	4,1	
14	43-45	13,1	16,9	38,7	13,5	7,2	2,3	6,5	7,3	21,2	9,0	1,7	
14	51	16,3	27,3	24,8	9,9	3,0	2,1	8,5	10,6	33,0	10,5	2,6	
13	47	13,2	23,4	49,6	20,3	6,6	1,8	4,2	10,9	28,8	11,1	2,0	
13	48-50	27,0	39,9	58,2	49,7	30,3	5,9	3,8	7,8	10,2	8,7	2,0	
10	47-52	10,2	8,2	20,7	20,7	4,0	2,3	3,2	3,8	6,8	4,7	1,2	
12	3a60	27,2	48,6	48,2	33,3	11,6	4,7	3,3	6,1	8,0	8,2	3,2	
16	43	16,7	25,1	32,1	14,9	12,7	3,3	6,5	7,8	8,6	7,4	1,2	
21	8	24,1	55,2	59,9	76,6	21,3	16,1						
20	7	18,5	51,5	56,0	40,0	25,1	9,0						
10	5a13	11,9	19,9	27,4	11,7	3,4	2,0	7,1	12,9	23,7	14,7	2,1	
17	8a27	12,5	40,2	33,9	5,8	3,1	2,1	6,4	14,1	25,1	14,0	2,2	
17	8a9	73,7	90,0	120,0	33,8	21,4	3,7	5,5	12,7	15,9	9,0	1,5	
23	3a7	18,7	31,7	53,3	34,4	14,3	6,3	10,4	18,6	36,6	13,7	1,6	
10	11a15	27,0	79,3	129,0	62,6	37,0	10,7	5,5	13,6	18,7	16,7	3,6	

Tabela 5: Característica dos sujeitos no teste de sensibilidade ao contraste de luminância (continua) ção)

Idade	Del e ção	SC Luminância						SC Cromático Temporal					
		0,5	1,0	1,9	5,3	9,7	19,4	1,0	2,0	10,0	20,0	33,0	
15	não	18,5	19,7	28,2	41,7	14,2	4,9						
18	não	9,1	14,0	13,6	4,0	1,8	2,0						
11	não	8,8	7,3	15,0	10,5	2,4	1,5						
14	não	28,0	36,1	60,4	37,2	23,3	12,4						
10	não	9,6	21,7	19,2	17,5	8,0	4,7						
12	não	22,7	28,0	51,8	33,7	14,5	5,6						
18	não	42,2	102,0	91,8	10,2	4,4	2,0						
19	não	45,6	76,3	92,3	68,4	27,3	12,3						
9	não	12,2	63,0	52,8	24,5	5,3	1,8						
9	não	17,8	31,7	34,6	32,0	11,9	3,3						
9	não	9,4	11,0	8,5	7,4	2,5	1,5	7,3	11,6	23,9	15,1	1,9	
18	não	14,5	32,6	69,2	39,8	9,5	5,0	6,0	12,3	24,8	13,9	2,3	
17	não	11,1	20,5	12,9	8,6	3,0	1,3	2,2	9,2	11,2	20,3	3,5	
20	não	6,8	5,7	5,7	3,4	6,6	2,6	4,4	4,6	7,7	5,6	2,1	
8	não	2,8	7,1	35,3	32,8	13,4	8,6	5,2	13,2	34,3	14,7	2,4	
10	não	32,2	40,9	72,8	82,2	36,2	18,0	9,2	14,6	42,5	21,9	2,9	
19	não	21,0	76,4	74,1	123,0	13,3	11,1	8,8	18,7	40,7	18,6	3,8	
13	não	6,7	11,2	14,5	15,7	3,1	2,1	10,1	11,8	22,7	10,0	1,8	
13	não	39,1	51,8	118,0	34,0	27,5	12,6	8,7	12,0	19,4	12,8	2,2	
15	não	28,5	48,8	108,0	104,0	29,3	21,6	5,7	15,3	19,8	13,1	2,7	
10	Controle	51,7	103,0	169,0	189,0	32,5	24,6	18,3	28,4	52,9	31,5	2,6	
18	Controle	59,2	162,0	232,0	300,0	121,0	79,2	12,5	19,5	36,3	19,2	3,0	
17	Controle	40,5	112,0	101,0	125,0	90,9	40,9	10,3	16,6	20,5	12,4	2,3	
20	Controle	74,1	189,0	204,0	143,0	59,5	35,2						
19	Controle	54,0	146,0	186,0	102,0	65,4	25,7						
10	Controle	74,1	189,0	204,0	143,0	59,5	35,2	9,4	14,0	32,2	19,3	3,9	
19	Controle	39,2	85,7	130,0	141,0	127,0	60,8						
17	Controle	62,9	110,0	182,0	120,0	85,3	24,6	10,0	10,2	22,0	9,9	1,6	
16	Controle	43,8	80,4	115,6	111,7	72,6	41,6	8,7	11,1	18,6	9,1	2,3	
20	Controle	40,9	86,0	257,0	202,0	101,0	39,8						
12	Controle	39,7	89,8	173,0	102,9	43,5	12,9	9,5	12,1	44,9	16,8	3,2	
23	Controle	40,2	67,1	162,0	105,0	42,8	29,8	12,6	14,3	27,5	19,7	1,7	
20	Controle	41,9	105,0	153,0	153,0	133,0	72,0						
17	Controle	54,0	146,0	186,0	102,0	65,4	25,7	14,9	18,9	75,3	22,0	3,2	
17	Controle	52,5	116,0	202,0	129,0	76,8	20,0						
19	Controle	71,7	101,0	158,0	138,0	71,7	26,3	16,3	23,9	69,1	23,7	4,1	
21	Controle	51,0	116,0	129,0	125,0	91,4	20,1	6,5	10,7	53,7	15,0	3,2	



Figura 13: simulação da situação da medida de sensibilidade ao contraste de luminância. O sujeito permanecia sentado há 1 metro de distância do monitor onde eram apresentados os estímulos. Em nossa rotina, o experimentador manipulava a caixa de respostas. Podemos observar no centro do monitor o padrão de ondas senoidais utilizados como estímulos.

uniforme. A partir deste ponto, o examinador aumentava o nível de contraste, também em passos de 1%, até o momento em que o sujeito referisse estar vendo o estímulo novamente. Todo este processo foi repetido 3 vezes, para se obter o limiar do contraste e a apresentação dos diferentes tamanhos de ondas era aleatória determinada pelo software.

III.5.3. Sujeitos e Equipamento: Contraste Temporal

Para a medida de sensibilidade ao contraste de luminância para estímulos com variação temporal, o estímulo utilizado foi um flicker com modulação senoidal entre preto e branco que continha uma função Gabor sobreposta com 2,7 graus de raio e faixa de corte para a luminância média em 1 desvio padrão. Foi utilizado o mesmo sistema operacional utilizado para o contraste espacial. Os dados referentes às características da amostra estão na tabela 5.

III.5.4. Protocolo de Testagem

As frequências temporais utilizadas foram de: 1, 2, 10, 20 e 33 Hertz (Hz). A luminância média foi a mesma utilizada na avaliação espacial: 34.4 cd/m².

A metodologia de testagem foi idêntica a empregada na avaliação espacial, exceto que, o sujeito tinha que responder ao examinador com referência ao piscar do estímulo, ou seja, quando ele não percebia mais o piscar no centro da tela e no exato momento em que ele estivesse vendo o estímulo novamente.

Para ambos os testes de sensibilidade ao contraste – espacial e temporal - toda a análise foi realizada monocularmente e no mesmo olho em que aplicamos os testes de visão de cores e o eletrorretinograma.

IV. Resultados

IV.1. Visão de Cores

Todos os pacientes realizaram o teste de visão de cores de Cambridge. Os valores de mediana e dos quartís de 25% e 75% obtidos nos 3 principais eixos de confusão para os 3 grupos de DMD e para o grupo controle no Trivector estão expressos na tabela 6. Estes limiares são expressos em unidades $u'v'$ do espaço de cor CIE 1976.

No Trivector, observamos uma diferença estatisticamente significativa entre os controles e os DMD sem deleção (grupo1) e DMD com deleção downstream ao exon 30 (grupo 3) (Kruskal-Wallis Análise de Variância em Ranks, $h=23.368$; $p < .0001$; Dunn PostHoc Multicomparison Test) para o eixo protan, assim como para o eixo deutan (Kruskal-Wallis Análise de Variância em Ranks, $h= 21.065$; $p < 0,0001$; Dunn PostHoc Multicomparison Test) e para o eixo tritan (Kruskal-Wallis Análise de Variância em Ranks, $h= 24.096$; $p < 0,0001$; Dunn PostHoc Multicomparison Test). Todos estes resultados estão ilustrados na figura 14.

A elipse de MacAdam foi obtida ao redor do mesmo ponto no diagrama de cromaticidade da CIE utilizado no ruído de fundo para o Trivector. As áreas medidas em unidades $u'v'$ são mostradas na tabela 6. Valores de área maiores e estatisticamente significante (Kruskal-Wallis Análise de Variância em Ranks, $h= 24.679$; $p < 0,0001$; Dunn PostHoc Multicomparison Test) foram encontrados para os grupos 1 e 3 de DMD quando comparados com os controles (figura 15).

Os dois conjuntos de resultados, dos testes Trivector e Elipses, comparados com os resultados do grupo controle, permitiram classificar os defeitos apresentados pelos sujeitos testados. Foram levados em consideração os limiares no Trivector, a extensão e

Tabela 6: Limiares de discriminação cromática CCT

	Visão de Cores			
	Protan	Deutan	Tritan	Ellipse
Controles	46 (35/ 67)*	47 (30/ 62)	59 (47/ 72)	301 (249/ 605)
DMD sem deleção	87 (67/ 121)	79 (64/ 106)	117 (82/ 147)	739 (603/ 1466)
DMD deleção up30	53 (47/ 66)	64 (56/ 68)	88 (70/ 103)	578 (470/ 603)
DMD deleção down30	98 (74/ 115)	84 (51/ 109)	106 (87/ 147)	892 (561/ 1522)

* mediana (quartil25%/ quartil75%)

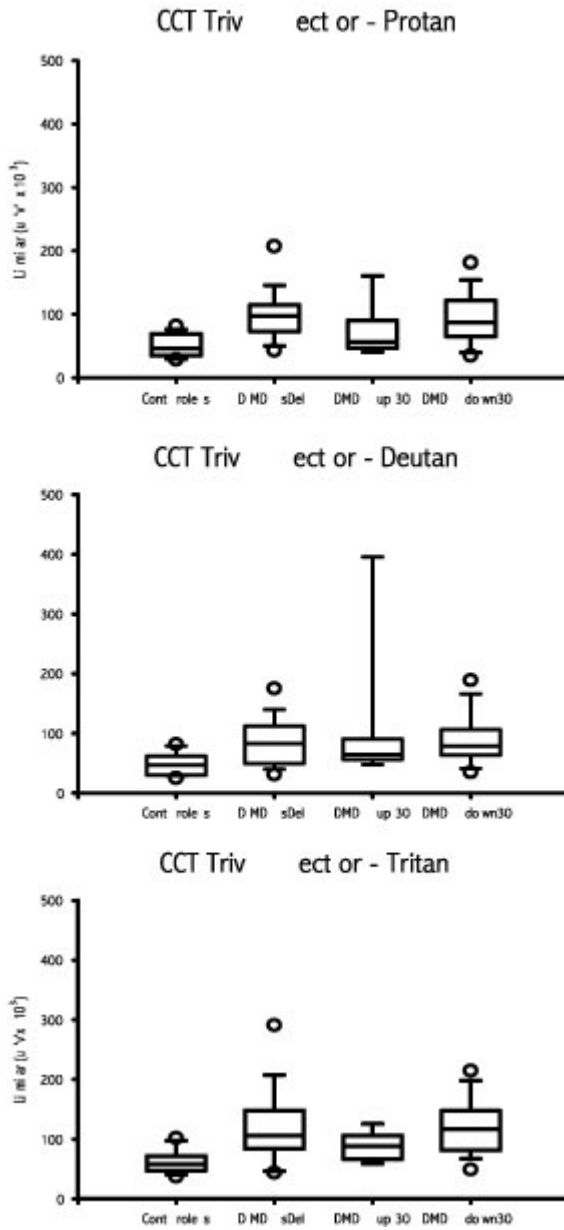


Figura 14: gráfico ilustra os valores de mediana e quartis (25% e 75%) para os 3 principais eixos de confusão do Trivector. Diferenças estatísticas foram encontradas entre os controles e os sujeitos com DMD sem deleção e com deleção posterior ao exon 30.

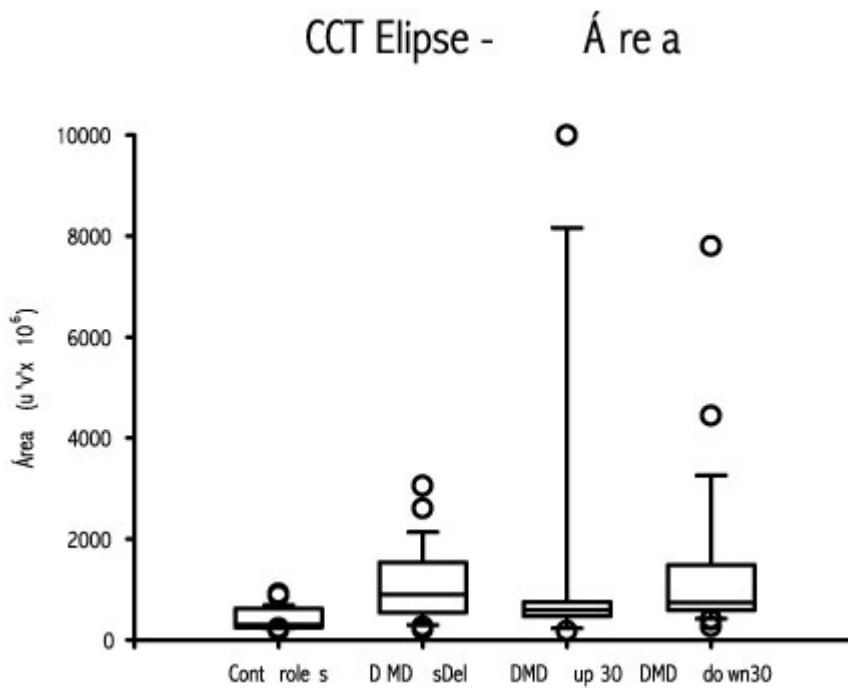


Figura 15: mostrando os valores de mediana e quartis (25% e 75%) para as elipses de discriminação cromática. Diferenças estatísticas foram encontradas entre os controles e os sujeitos com DMD sem deleção e com deleção posterior ao exon 30.

ângulo do eixo maior da elipse e a área da elipse, tal como descrito na seção de Métodos, na qual os critérios estão detalhados,

Surpreendentemente, defeitos de discriminação para o eixo protan-deutan foram encontrados em 27/54 (50%) dos sujeitos com DMD. Separando-os de acordo com os grupos temos: 7/20 (35%) dos sujeitos do grupo 1, sendo 3 (15%) defeitos protanômalos, 3 (15%) defeitos deuteranômalos e 1 (5%) sujeito que mostrou uma perda inespecífica protan-deutan. No grupo 2, observamos 1/7 (16%) defeito deuteranópico. Para os sujeitos do grupo 3, os defeitos foram encontrados em 14/27 (52%), sendo 9 (33%) defeitos protanômalos e 2 (7%) defeitos deuteranômalos e 1 (3%) inespecífico.

Alterações que levam a um defeito de visão de cores difuso foram encontradas em 3/21 (15%) sujeitos do grupo 1 e em 2/27 (7%) sujeitos do grupo 3 (tabela 7).

Para confirmar os resultados de defeitos de visão de cores no eixo verde-vermelho, os sujeitos foram testados no anomaloscópio de Neitz e foi calculada a equação de Rayleigh para todos os sujeitos. Na tabela 7 estão expressos o valor do ponto médio da equiparação e a respectiva amplitude. O teste do Chi-quadrado mostrou que não há diferença entre as classificações dos defeitos de visão de cores baseadas pelo CCT e pelo anomaloscópio para nenhum dos grupos. Os respectivos resultados estatísticos foram: grupo 1 (Chi= 2.739, p=0.602), grupo 2 (Chi= 0.054, p=0.973) e grupo 3 (Chi= 1.701, p=0.999).

Uma vez que este defeito protan-deutan foi determinado, em cada grupo de DMD, separamos estes sujeitos com defeito de visão de cores do restante em outro subgrupo. A análise de variância (Kruskal-Wallis Análise de Variância em Ranks; Dunn PostHoc Multicomparison Test) dos subgrupos que não apresentaram defeito no eixo protan-

Tabela 7: Resultados dos testes de visão de cores dos sujeitos com Distrofia Muscular de Duchenne e controles

Diagnóstico	Idade	Deleção	Trívectro r			Área Elipse	Ângulo Elipse	Classif. CCT	Anomal.		Classif. Anomal.
			Protan	Deutan	Tritan				Q. A	P.M. (ampl.)	
DMD	9	47-52	99	105	209	4441,1	23,0	protanormal	0,87	45 (17,0)	protanormal o
DMD	9	48-52	141	134	118	1251,5	46,8	protanormal o	0,97	43 (3,5)	normal
DMD	15	50	88	89	110	881,2	52,1	normal	0,86	44 (2,0)	normal
DMD	15	47-48	69	79	117	708,8	57,7	normal	0,92	44 (1,5)	normal
DMD	12	50	81	64	81	478,5	105,5	normal	0,92	44 (1,5)	normal
DMD	12	50	156	174	149	1498,9	145,7	deuteranormalo	0,92	44 (11,0)	deuteranormalo
DMD	13	47-50	117	120	205	3365,9	81,6	difuso	1,03	42 (2,5)	normal
DMD	8	50	119	107	82	1264,7	67,3	protanormal o	0,92	44 (5,0)	protanormal o
DMD	9	45	102	74	122	955,1	62,9	protanormal o	0,84	45,5 (20,0)	protanormal o
DMD	16	49-50	72	89	80	528,0	28,6	protanormal o	0,94	43,5 (7,5)	protanormal o
DMD	9	43	281	195	144	2827,0	164,2	deuteranormalo	0,79	43 (1,0)	normal
DMD	9	47-52	139	46	103	747,2	59,6	protanormal o	0,73	48 (3,5)	normal
DMD	18	46-55	36	35	53	257,5	50,6	normal	0,92	44 (15,0)	protanormal o
DMD	13	51	87	91	136	627,5	52,1	normal	0,87	45 (1,5)	normal
DMD	21	49-52	146	188	249	1563,3	78,4	difuso	0,81	44 (2,5)	normal
DMD	20	45-47	42	40	26	502,7	95,0	inespecífico verde-vermelho	1,36	37 (2,5)	normal - desviante
DMD	20	51-52	46	69	69	578,5	89,6	normal	1,28	38 (2,0)	normal - desviante
DMD	18	48-51	84	84	129	739,0	85,5	normal	0,75	47,5 (1,5)	normal
DMD	19	50	51	63	81	711,0	65,7	normal	0,87	45 (3,0)	normal
DMD	13	48-52	26	52	82	647,5	119,1	normal	1,25	38,5 (2,0)	normal - desviante
DMD	14	43-45	81	70	132	629,2	46,0	normal	0,66	49,5 (4,0)	normal - desviante
DMD	14	51	39	33	67	384,1	75,7	normal	0,97	43 (20,0)	protanormalo
DMD	13	47	64	60	89	405,8	88,3	normal	1,03	42 (3,5)	protanormalo
DMD	13	48-50	82	79	84	711,0	69,7	normal			
DMD	10	47-52	164	125	167	1708,0	66,9	protanormalo			
DMD	12	3a60	111	81	170	7795,1	69,1	protanormalo			
DMD	16	43	122	73	154	1432,8	53,5	protanormalo			

Tabela 7 (continuação): Resultados dos testes de visão de cores dos sujeitos com Distrofia Muscular de Duchenne e controles

Diagnóstico	Idade	Deleção	Trivector			Área Elipse	Ângulo Elipse	Classif. CCT	Anomal.		Classif. Anomal.
			Protan	Deutan	Tritan				Q. A	P.M. (ampl.)	
DMD	21	8	56	69	109	437,2	75,0	normal	0,9	44 (2,0)	normal
DMD	20	7	49	62	88	608,4	60,3	normal	1,0	42 (1,5)	normal
DMD	10	5a13	97	98	130	793,6	178,7	normal	0,8	47 (0,5)	normal
DMD	17	8a27	39	65	58	169,8	67,6	normal			
DMD	17	8a9	46	46	75	569,7	72,6	normal	0,9	45 (1,0)	normal
DMD	23	3a7	176	470	64	1,45E+13	159,6	deuteranopia	1,4	36,5 (73,0)	deuteranopia
DMD	10	11a15	69	54	97	587,1	70,1	normal	1,2	38,5 (4,5)	normal - desviante
DMD	18	não	114	93	145	1565,5	69,6	difuso			
DMD	17	não	127	130	342	958,5	12,9	protanomalo			
DMD	20	não	72	58	122	834,1	70,1	normal	1,3	38 (2,5)	normal - desviante
DMD	8	não	149	150	151	3050,9	78,7	Inespecifico verde-vermelho			
DMD	10	não	82	86	79	810,1	24,8	protanomalo	0,8	46 (8,5)	protanomalo
DMD	19	não	53	36	67	254,5	131,6	deuteranomalo	1,0	43 (9,0)	deuteranomalo
DMD	13	não	112	64	150	1661,1	63,4	normal	1,2	39 (2,0)	normal - desviante
DMD	13	não	39	44	45	339,5	47,2	normal	0,8	46 (2,0)	normal
DMD	15	não	111	81	175	1263,2	71,1	difuso	0,8	46 (5,0)	normal - pobre
DMD	15	não	95	91	126	646,1	20,7	protanomalo	1,1	44 (11,0)	protanomalo
DMD	18	não	100	26	91	497,3	83,0	difuso	1,0	43 (8,5)	protanomalo
DMD	11	não	84	45	93	677,5	87,0	normal			normal
DMD	14	não	116	105	89	1508,0	68,9	difuso			
DMD	10	não	63	53	48	582,2	68,0	normal	1,1	40 (1,2)	normal
DMD	12	não	107	120	113	1639,8	179,9	deuteranomalo			
DMD	18	não	47	46	42	206,5	170,2	deuteranomalo			
DMD	19	não	90	60	98	470,1	67,5	normal	1,4	37 (1,5)	normal
DMD	9	não	142	120	146	950,3	81,9	protanomalo	0,8	47 (9,0)	protanomalo
DMD	9	não	265	200	240	2600,0	96,9	normal	1,2	43 (6,0)	normal - pobre
DMD	9	não	74	100	99	1095,3	101,8	normal	1,3	38 (2,5)	normal - desviante

Tabela 7 (continuação) : Resultados dos testes de visão de cores dos sujeitos com Distrofia Muscular de Duchenne

Diagnóstico	Idade	Trivector			Área El ipse	Ângulo	Classif. CCT
		Protan	Deutan	Tritan			
Normas	17	39	30	57	231,5	71,3	normal
Normas	18	33	23	60	238,9	50,7	normal
Normas	18	33	33	40	224,4	79,3	normal
Normas	16	46	49	63	279,6	86,2	normal
Normas	17	29	26	60	185,9	67,6	normal
Normas	18	40	33	48	265,3	78,3	normal
Normas	23	33	40	57	303,3	80,5	normal
Normas	21	46	46	52	347,1	94,0	normal
Normas	20	44	29	47	240,2	64,1	normal
Normas	18	26	29	45	265,1	91,9	normal
Normas	17	35	29	29	190,7	90,2	normal
Normas	18	29	30	44	299,3	92,1	normal
Normas	17	46	47	47	244,5	90,0	normal
Normas	19	36	36	39	279,5	86,7	normal
Normas	18	43	29	55	262,4	59,8	normal
Normas	17	54	58	50	876,1	65,1	normal
Normas	20	62	62	86	566,7	65,9	normal
Normas	11	49	61	70	437,1	63,6	normal
Normas	10	71	47	77	673,5	97,6	normal
Normas	11	69	61	102	618,3	62,4	normal
Normas	10	94	85	102	684,6	94,8	normal
Normas	12	59	62	72	205,4	83,4	normal
Normas	11	76	81	71	381,8	75,6	normal
Normas	10	76	70	98	191,9	95,7	normal
Normas	12	72	80	66	191,4	90,1	normal
Normas	12	78	65	96	226,2	82,1	normal

deutan (Grupo 1, n= 10; Grupo 2, n=6; Grupo 3, n=13) mostrou uma diferença estatística entre os controles e os sujeitos do grupo 3 para todos os parâmetros do teste Trivector – protan, (h=7.809; p=0.049); deutan (h=7.837; p=0.049); tritan (h=10.390; p=0.016) - e elipse (h=7.953; p=0.047), mostrados na figura 16.

Além da área da elipse, a relação entre os eixos principais, perpendicularmente opostos, pode ser usada como um indicador para apontar se o defeito é difuso (razão próxima de 1, até no máximo 2) ou apresenta uma direção específica no diagrama de cromaticidade (razão >2). Em nossos dados, excluindo os pacientes que apresentaram os defeitos no eixo verde-vermelho acima citados, não observamos diferenças estatísticas da relação entre os eixos de todos os grupos de DMD quando comparamos com os controles (Kruskal-Wallis Análise de Variância em Ranks, p= 0,178). Estes dados são mostrados na figura 17.

O ângulo do eixo maior da elipse é o indicador do tipo de defeito que o sujeito apresenta. Nos tricromatas, o ângulo varia de 65° a 85°. Nos sujeitos com alteração na visão de cores protanópica, o ângulo da elipse variou de 5° a 40°, nos sujeitos com alteração deuteranópica entre 155° e 180° e nos sujeitos com alteração tritanópica entre 95° e 110°. Nossos dados não mostraram diferença estatística (Kruskal-Wallis Análise de Variância em Ranks, p= 0,448) entre os ângulos dos grupos de DMD com os grupo controle (figura 18), quando se excluem os sujeitos com defeitos no eixo protan-deutan.

Correlações entre os limiares nos eixos do trivector com o número de genes deletados (v. Tabela 7) dos sujeitos dos grupos 2 e 3 não mostram significância estatística : grupo 2 (protan - p =0,438; deutan - p= 0,388; tritan - p= 0,843; elipse p= 0,660 - Spearman Rank Order Correlation); grupo 3 (protan - p =0,394; deutan - p= 0,128; tritan -

$p= 0,184$ - Spearman Rank Order Correlation) mas para o grupo 3, o resultado da elipse mostrou correlação positiva leve a moderada entre a área da elipse e o número de genes deletados ($r= 0.394$; $p= 0,038$ - Spearman Rank Order Correlation).

Para o grupo que tem deleção downstream ao exon 30 (grupo3), as correlações entre o exon de início da deleção e o resultado dos limiares dos eixos do Trivector e da área da elipse não mostram significância estatística (protan - $p=0,363$; deutan - $p= 0,326$; tritan - $p= 0,100$; elipse $p= 0,269$ - Spearman Rank Order Correlation).

Para todos os parâmetros do CCT utilizamos como limites de normalidade a mediana e os valores que excedem os 95% obtidos pela tabulação direta dos dados (limites não-paramétricos). Podemos observar na figura 19 que para o eixo protan, excluindo os sujeitos com defeitos protanópicos e deuteranópicos, 4/10 (40%) sujeitos do grupo 1; 3/13 (23%) do grupo 3 excederam os limites de normalidade. Para o eixo deutan, 2/10 (20%) dos sujeitos do grupo 1; 3/13 (23%) do grupo 3 mostraram estar fora dos limites de confiança. No eixo tritan, 5/10 (50%) do grupo 1; 5/13 (29%) do grupo 3 estão fora dos limites de confiança. Para a elipse, observamos que 3/10 (30%) do grupo 1; 1/13 (8%) do grupo 3 estão fora dos limites de normalidade.

Os testes de visão de cores Ishihara e AO H-R-R foram aplicados em 48/54 crianças (89%) com DMD. Destas 6 crianças, 2 faleceram e 4 não apresentaram colaboração para que o exame fosse confiável. Para estes testes, observamos uma capacidade inferior de detecção de alterações na visão de cores para o eixo prota-deutan, pois o AO H-R-R foi capaz de identificar 24% de alterações e o Ishihara apenas 16% de defeitos na visão de cores nos sujeitos com DMD.

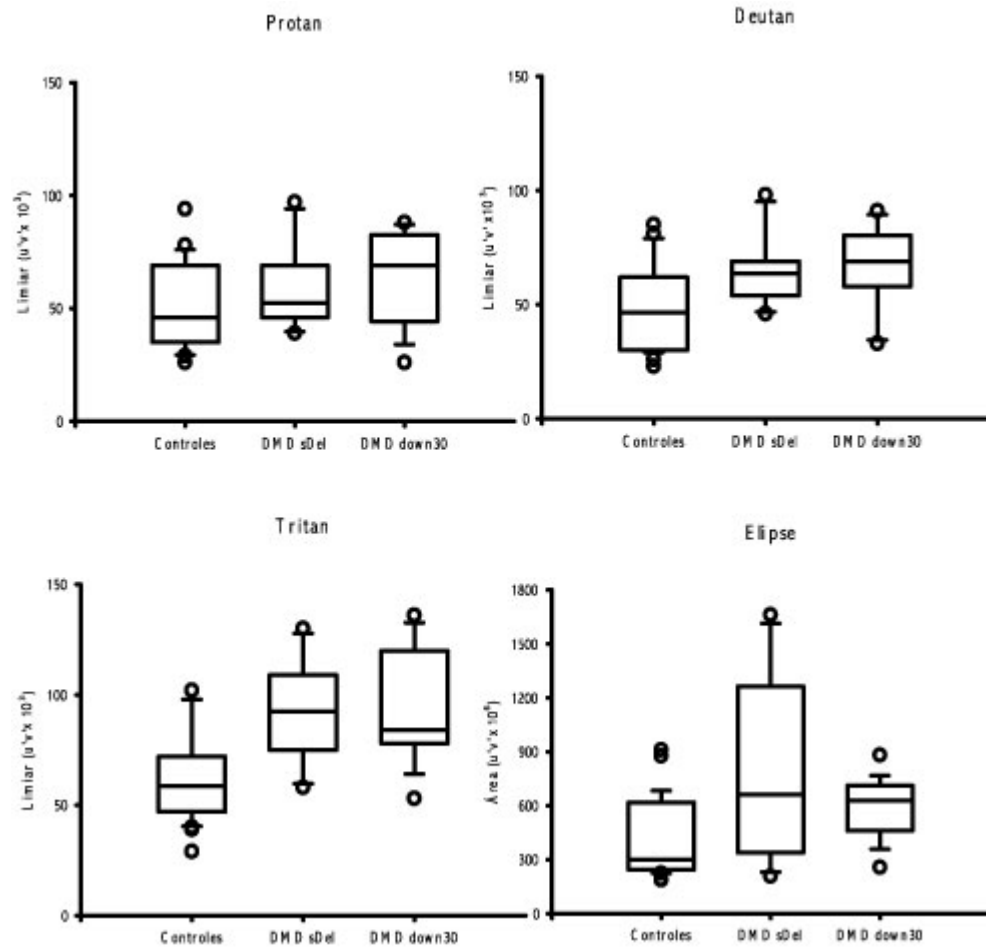


Figura 16: valores de mediana e quartís (25% e 75%). Mesmo após a divisão dos grupos, os sujeitos com DMD do grupo 3 apresentam resultados de visão de cores estatisticamente reduzidos, em relação ao grupo controle, em todos os parâmetros do Trivector e elipse.

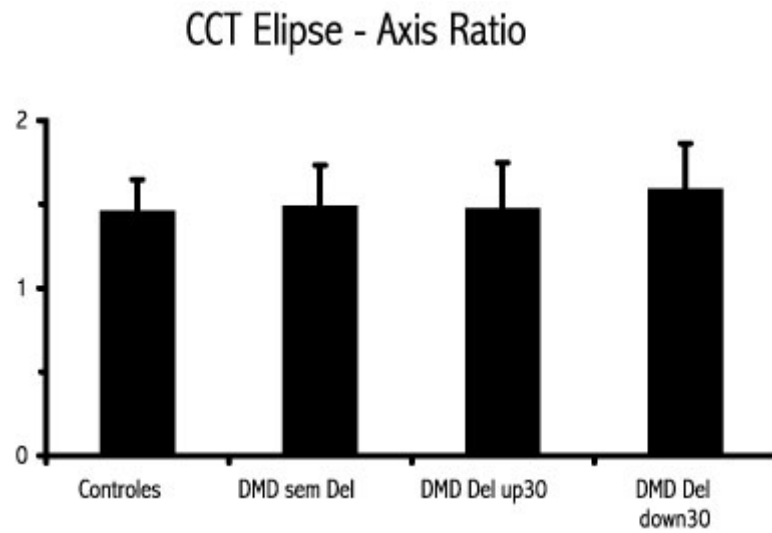


Figura 17: valores de média e desvio padrão para a relação entre os eixos principais da elipse de discriminação cromática. Diferenças estatísticas não foram encontradas entre os controles e os sujeitos com DMD, embora se observe uma tendência a ser maior do que os normais.

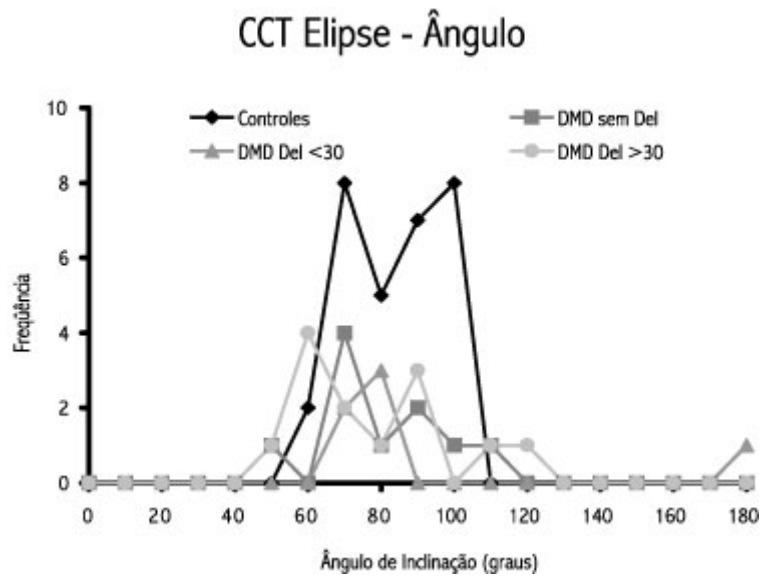


Figura 18: ângulo de inclinação do eixo principal da elipse de discriminação cromática. Diferenças estatísticas não foram encontradas entre os controles e os sujeitos com DMD, embora se observe uma menor concentração ao redor de 90° como nos controles.

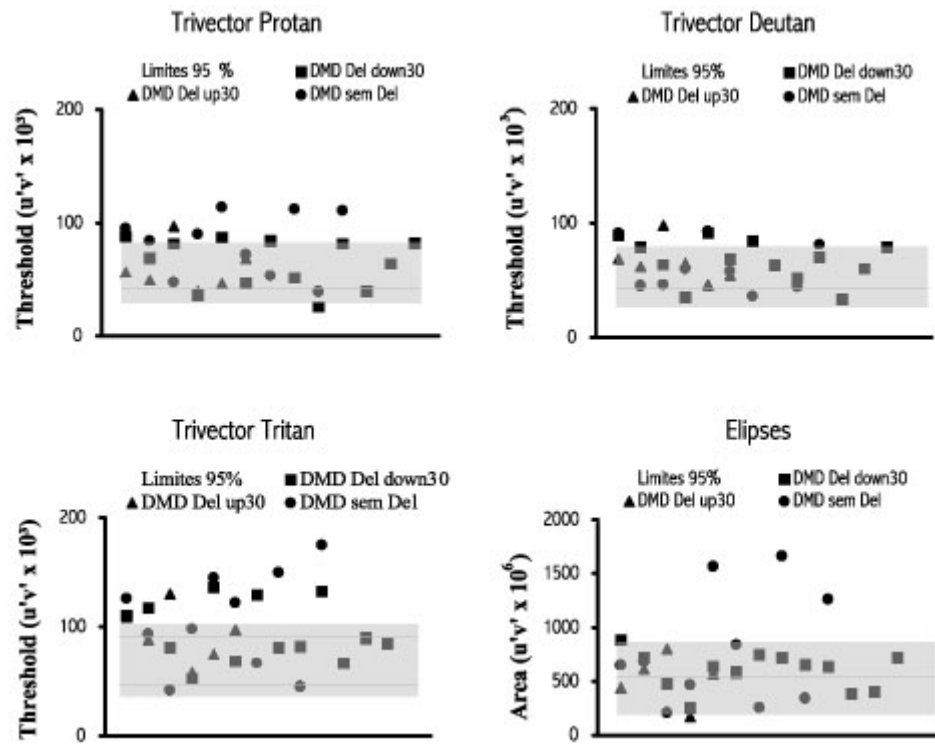


Figura 19: dispersão dos resultados obtidos nos testes de visão de cores dos sujeitos com DMD sem o defeito no eixo protan-deutan. As áreas em cinza representam o intervalo de confiança de 95%. Para os 3 eixos de confusão principais testados no Trivector notamos que aproximadamente 20% dos sujeitos do grupo 1 e 3 estão fora dos limites de normalidade. No teste da elipse notamos 3 sujeitos do grupo 1 e apenas 1 do grupo 3 fora dos limites.

O teste de Wilcoxon mostrou que não existe similaridade entre os resultados obtidos pelo teste de Ishihara ($W = -28.000$, $p = 0.016$) e AO H-R-R ($W = -120.000$, $p < 0.001$) com os resultados obtidos no CCT e com os obtidos pelo anomaloscópio (Ishihara, $W = -25.000$, $p = 0.025$; AO H-R-R, $W = -117.000$, $p = 0.004$).

IV.2. Sensibilidade ao Contraste

IV.2.1. Sensibilidade ao Contraste Espacial

Os dados de sensibilidade ao contraste espacial de luminância mostraram uma diferença estatística entre todos os grupos - controles e DMD - para todas as frequências espaciais testadas: 0,5 cpg ($h = 12,965$; $p = 0,005$); 1,0 cpg ($h = 16,790$; $p < 0,001$); 2,0 cpg ($h = 17,790$; $p < 0,001$); 5,3 cpg ($h = 30,025$; $p < 0,001$); 9,7 cpg ($h = 28,760$; $p < 0,001$); 19,4 cpg ($h = 31,440$; $p < 0,001$) - Kruskal-Wallis – ANOVA em Ranks; Dunn PostHoc Multicomparison Test - (figura 20). Porém, o resultado do teste de comparações múltiplas mostrou que esta redução na sensibilidade ao contraste é diferente entre os grupos, tendo os sujeitos do grupo 2 uma sensibilidade melhor do que os sujeitos do grupo 1 e estes uma sensibilidade melhor do que os do grupo 3, porém, todos os grupos são diferentes do grupo controle.

Separamos em um outro subgrupo os dados de sensibilidade ao contraste dos sujeitos que apresentaram alterações no eixo protan-deutan. Tal divisão não alterou o resultado anterior mostrando que ambos os subgrupos, com e sem prejuízo da visão de cores, apresentam uma redução significativa da sensibilidade ao contraste em todas as frequências espaciais, quando comparados com os controles. Este resultado foi observado nos sujeitos do grupo 1: 0,5 cpg ($h = 23,565$; $p < 0,001$); 1,0 cpg ($h = 24,717$; $p < 0,001$);

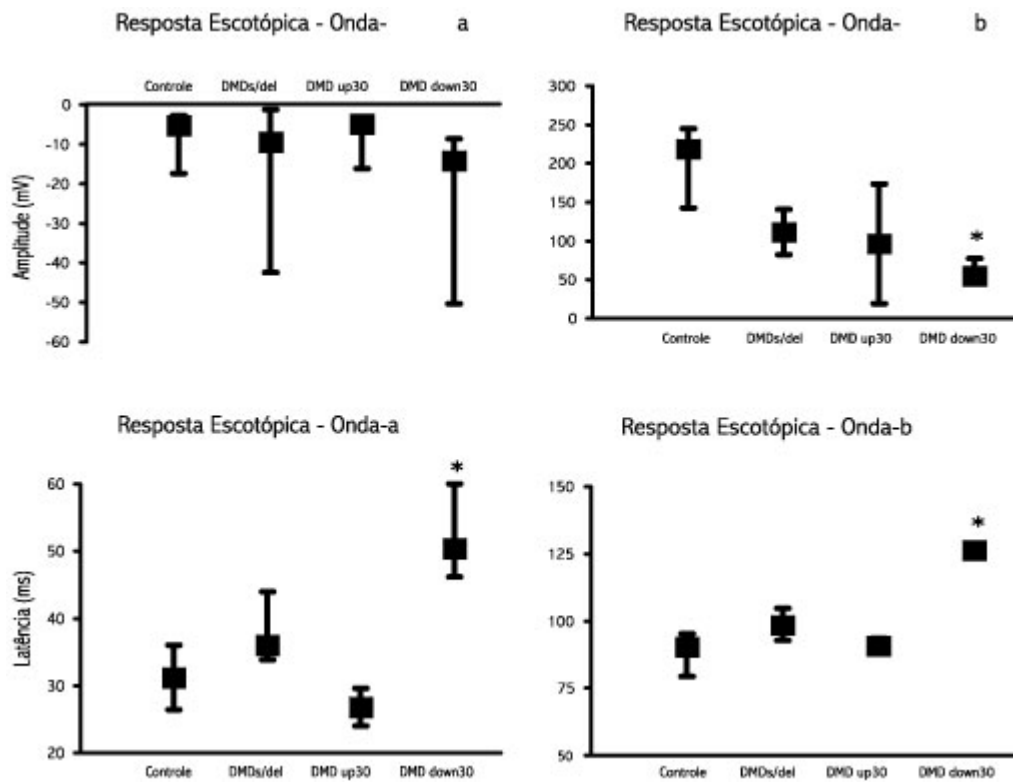


Figura 20: valores de mediana da amplitude (superior) e latência (inferior) da onda-a (coluna da esquerda) e da onda-b (coluna da direita) para a resposta dos bastonetes. As barras indicam os quartis de 25% e 75%. Diferença estatística entre controles de DMD com deleção posterior ao exon 30 foi obtida para a latência das ondas -a e -b indicando uma maior tempo de resposta dos DMD e para a amplitude da onda-b que nos sujeitos com DMD se mostrou reduzida.

2,0 cpg (h= 26,024; p< 0,001); 5,3 cpg (h= 24,088; p< 0,001); 9,7 cpg (h= 26,535; p< 0,001); 19,4 cpg (h= 25,611; p< 0,001) e do grupo 3: 0,5 cpg (h= 24,778; p< 0,001); 1,0 cpg (h= 30,713; p< 0,001); 2,0 cpg (h= 29,511; p< 0,001); 5,3 cpg (h= 25,022; p< 0,001); 9,7 cpg (h= 29,882; p< 0,001); 19,4 cpg (h= 30,117; p< 0,001).

Uma possível correlação entre o número de genes deletados e a redução na sensibilidade ao contraste não foi confirmada entre o grupo controle e os sujeitos com DMD para nenhuma das frequências espaciais testadas. Não foi encontrada, também, nenhuma correlação entre os resultados obtidos nos parâmetros avaliados no teste de visão de cores e os obtidos na sensibilidade ao contraste, para nenhum dos grupos de DMD.

IV.2.2. Sensibilidade ao Contraste Temporal

Os dados de sensibilidade ao contraste de luminância com modulação temporal mostraram uma diferença estatística pela análise de variância (Kruskal-Wallis ANOVA em Ranks; Dunn PostHoc Multicomparison Test) entre o grupo controle e os sujeitos do grupo 3, para as frequências temporais: 1 Hz (h= 16.230; p= 0,001); 2 Hz (h= 8.383; p= 0,039); 10 Hz (h= 8.788; p= 0,032); 20 Hz (h= 11.750; p= 0,008), exceto para a frequência de 33 Hz (h= 3.751; p= 0,294) na qual não houve diferença estatística (figura 21).

Semelhante à análise que realizamos nos dados da sensibilidade ao contraste espacial, separamos em um outro subgrupo os sujeitos que apresentaram alteração prota-deutan na visão de cores. Tal divisão não alterou o resultado anterior à separação dos sujeitos do grupo 1, os quais continuaram sem diferença estatística, quando comparados

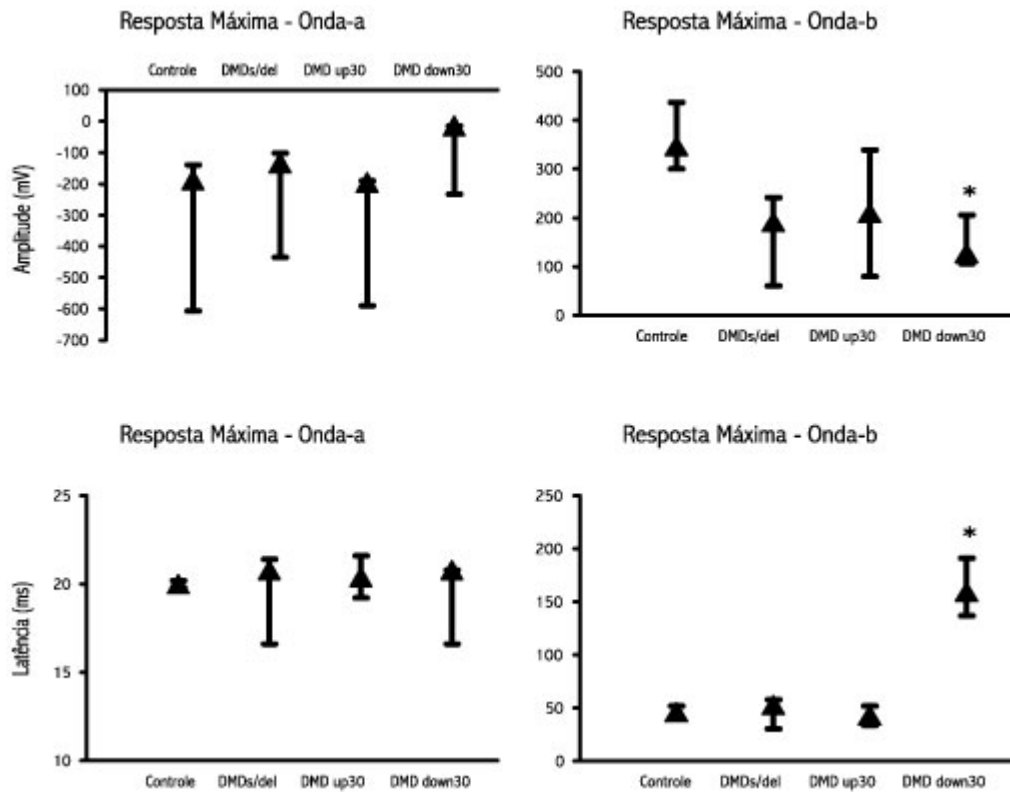


Figura 21: valores de mediana da amplitude (superior) e latência (inferior) da onda-a (coluna da esquerda) e da onda-b (coluna da direita) para a resposta dos bastonetes. As barras indicam os quartis de 25% e 75%. Diferença estatística entre controles de DMD com deleção posterior ao exon 30 foi obtida para a latência das ondas -a e -b indicando uma maior tempo de resposta dos DMD. Redução da amplitude da onda-b significativa também foi encontrada nos sujeitos com DMD.

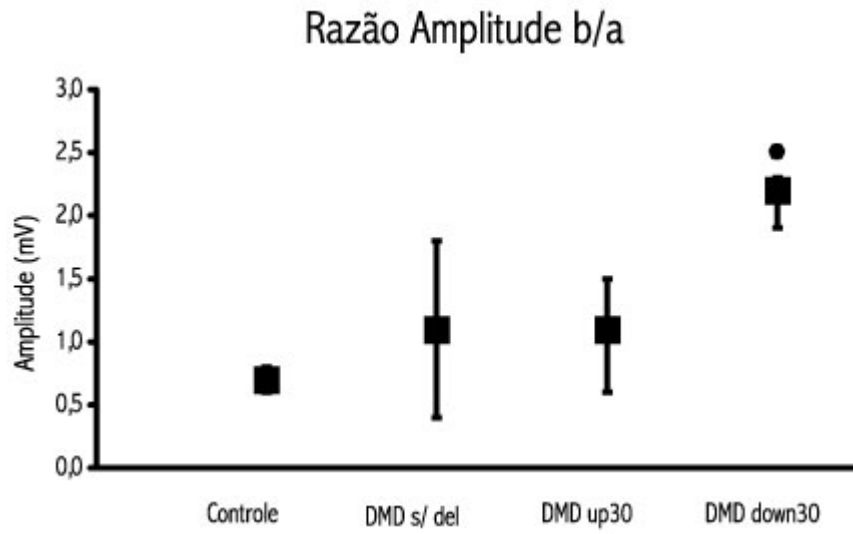


Figura 22: valores de mediana da razão da amplitude onda-b/ onda-a. As barras indicam os quartis de 25% e 75%. A diferença estatística foi significativa entre controles de DMD com deleção posterior ao exon 30.

Tabela 9. Correlação entre CSFt e visão de cores nos DMDs grupo 3

		Frequência Temporal				
		1	2	10	20	33
Protan	r	-0,728	-0,854	-0,817	-0,950	-0,731
	p	0,020	0,001	0,004	0,001	0,020
Deutan	r	-0,828	-0,828	-0,867	-0,833	-0,479
	p	0,002	0,002	0,001	0,002	0,169
Tritan	r	-0,628	-0,795	-0,850	-0,767	-0,555
	p	0,058	0,006	0,001	0,012	0,111
Área Elipse	r	-0,639	-0,567	-0,854	-0,653	-0,156
	p	0,058	0,099	0,001	0,050	0,676

r = coeficiente de correlação
 significância p < 0.05

com os controles. Mas, para os sujeitos do grupo 3, há uma diferença significativa entre o subgrupo dos sujeitos com redução da visão de cores e os controles para todas as frequências temporais: 1 Hz ($h= 9.848$; $p= 0,007$); 2 Hz ($h= 7.896$; $p= 0,019$); 10 Hz ($h= 9.170$; $p= 0,010$); 20 Hz ($h= 9.413$; $p= 0,009$) exceto para a frequência de 33 Hz ($h= 2.238$; $p= 0,327$) não houve diferença estatisticamente significativa (figura 22). O subgrupo sem alteração na visão de cores não mostrou diferença estatística.

Uma alta correlação inversamente proporcional com significância estatística foi encontrada entre os resultados do Trivector e os resultados obtidos na sensibilidade ao contraste temporal nos sujeitos com DMD do grupo 3. O eixo protan se correlacionou com todas as frequências temporais testadas. Os eixos deutan e tritan se correlacionaram com exceção da frequência temporal alta (33 Hz). No teste da elipse, valor de correlação significativo foi obtido somente para frequência temporal média (10 Hz). Os coeficientes de correlação e as significâncias estão expressas na tabela 8. Para os sujeitos com DMD dos grupos 1 e 2 não encontramos diferença estatística.

Semelhante a medida da sensibilidade ao contraste espacial nossos dados não apresentam correlação entre o número de genes deletados e a redução na sensibilidade ao contraste entre o grupo controle e os sujeitos com DMD para nenhuma das frequências espaciais testadas.

IV.3. Eletroretinograma

Os valores de mediana e quartis de 25% e 75% das amplitudes e latências das respostas do ERG estão mostrados na tabela 9.

A amplitude da resposta da onda-a dos bastonetes não mostrou diferença estatística entre os controles e os grupos dos DMD (Kruskal-Wallis, $p= 0,234$; Dunn PostHoc Multicomparison Test) enquanto que a latência do grupo controle é estatisticamente diferente do grupo 3 (Kruskal-Wallis, $p= 0,013$; Dunn PostHoc Multicomparison Test). Para a onda-b, tanto a amplitude (Kruskal-Wallis, $p= 0,09$; Dunn PostHoc Multicomparison Test) quanto a latência (Kruskal-Wallis, $p= 0,015$; Dunn PostHoc Multicomparison Test) mostraram uma diferença estatística entre os controles e os DMD do grupo 3 (figura 23).

De acordo com a literatura, os resultados mais evidentes são encontrados na onda-b da resposta máxima. Nossos dados mostraram que a amplitude (Kruskal-Wallis, $p= 0,334$; Dunn PostHoc Multicomparison Test) e a latência (Kruskal-Wallis, $p= 0,794$; Dunn PostHoc Multicomparison Test) da onda-a não foram diferentes entre os grupos de DMD e os controles. Entretanto para a onda-b, tanto a amplitude (Kruskal-Wallis, $p= 0,016$; Dunn PostHoc Multicomparison Test) quanto a latência (Kruskal-Wallis, $p= 0,048$; Dunn PostHoc Multicomparison Test) mostraram diferença estatística entre o grupo controle e o grupo 3 dos DMD (figura 24).

A relação b/a é menor do que 1 (ERG negativo) nos sujeitos com DMD, de acordo com a literatura. Encontramos uma diferença na relação b/a estatisticamente significativa entre os controles e o grupo 3 (Kruskal-Wallis, $p < 0,001$; Dunn PostHoc Multicomparison Test). Além disso, uma diminuição progressiva do valor desta pode ser observada na figura 25, o que indica que a distrofina está intimamente ligada com a geração desta resposta no ERG.

Tabela 8: Valores* dos parâmetros do ERG nos controles e DMD.

	Escotópica			
	amp-a	amp- b	lat-a	lat-b
Controles	-5,5 (-6.8; -2.8)	218.5 (142.8; 245)	31.2 (26.4; 36)	90.4 (79.4; 95.2)
Sem Deleção	-9.4 (-23.6; -1.3)	111.3 (82.6; 140.4)	36 (33.8; 44)	98.4 (92.8; 104.8)
Deleção up30	-4.9 (-6.4; -3.4)	96.4 (19.3; 173.4)	26.8 (24; 29.6)	90.8 (88; 93.6)
Deleção down30	-14.1 (-22.0; -8.6)	55.9 (47.5; 77.5)	50.4 (46.2; 60)	126.4 (125.2; 128)

	Resposta Máxima			
	amp-a	amp- b	lat-a	lat-b
Controles	-182.7 (-232; -140.2)	347 (300.6; 436.8)	20 (19.8; 20.2)	46.4 (40.6; 52)
Sem Deleção	-133.2 (-169; -101.4)	191.2 (59.9; 241.1)	20.8 (16.6; 21.4)	52.8 (30.4; 57.8)
Deleção up30	-195.3 (-199.5; -191)	209.1 (79.4; 338.7)	20.4 (19.2; 21.6)	42.8 (33.6; 52)
Deleção down30	-14.7 (-204; -14.2)	126.9 (105.7; 205.5)	20.8 (16.6; 20.8)	159.2 (137; 191)

	Potenciais Oscilatórios			
	amp PO 1	amp PO 2	amp PO 3	amp PO 4
Controles	5.2 (4.9; 8.2)	14.1 (11.3; 17.1)	42.9 (35.7; 57.7)	35.5 (26.4; 42.8)
Sem Deleção	6.7 (6.1; 7.9)	12.2 (11; 16.9)	30.4 (17.1; 42.6)	21.5 (9.5; 24.3)
Deleção antes 30	4.5 (3.2; 5.8)	13.2 (12.9; 13.5)	35.7 (13.5; 57.9)	21.1 (7.5; 4.6)
Deleção após 30	5.8 (2.7; 7.1)	13.2 (5.3; 14.6)	13.4 (6.3; 21.6)	12.7 (9.7; 13.4)

	Potenciais Oscilatórios			
	lat PO1	lat PO2	lat PO3	lat PO4
Controles	12 (11.2; 12)	16 (16; 16.8)	22.4 (21.6; 22.4)	28.8 (28.2; 30.2)
Sem Deleção	12.8 (11.8; 13.6)	16.8 (16; 17)	23.2 (22.2; 24)	29.6 (29; 30.8)
Deleção antes 30	10 (9.6; 10.4)	16.8 (15.2; 18.4)	23.6 (21.6; 25.6)	30.4 (29.6; 31.2)
Deleção após 30	12 (11.4; 17.4)	16 (15.4; 23.2)	23.2 (18.4; 27.4)	30.4 (21.4; 31.6)

	Cones adaptados à luz			
	amp-a	amp- b	lat-a	lat-b
Controles	-23.3 (-26.6; -19.5)	96.9 (67.7; 109.2)	13.6 (12.8; 14.4)	26.4 (26.4; 27.2)
Sem Deleção	-33.7 (-59.5; -28.5)	108.1 (99.4; 121.2)	13.6 (12.2; 16.8)	26.4 (23.2; 27.4)
Deleção antes 30	-27.1 (-33.3; -20.9)	85.6 (83.5; 87.7)	18 (12.8; 23.2)	26.8 (24.8; 28.8)
Deleção após 30	9.6 (-42.2; 12.9)	8.4 (3.8; 23.6)	20.8 (16; 23.8)	24.8 (18.2; 26)

	Flicker 30Hz			
	amp-a	amp- b	lat-a	lat-b
Controles	-46.7 (-70.3; -37.9)	67.6 (59.9; 83.7)	13.6 (13.4; 14.4)	27.2 (25.6; 30.4)
Sem Deleção	-68.9 (-74; -57.5)	75.2 (63.1; 95.8)	13.6 (10.6; 15.4)	27.2 (22.2; 29.4)
Deleção antes 30	-28.9 (-52.2; -5.6)	36.8 (16; 57.6)	11.2 (6.4; 16)	30.8 (24.8; 36.8)
Deleção após 30	-48.4 (-82.5; -23.8)	54.6 (46.1; 77.4)	16.8 (15; 27.6)	32 (29; 33.2)

amp-a: amplitude da onda-a; amp-b: amplitude da onda-b; lat-a: latência da onda-a;

lat-b: latência da onda-b; PO1: potencial oscilatório 1; PO2: potencial oscilatório 2;

PO3: potencial oscilatório 3; PO4: potencial oscilatório 4.

* mediana (quartil 25% ; quartil 75%)

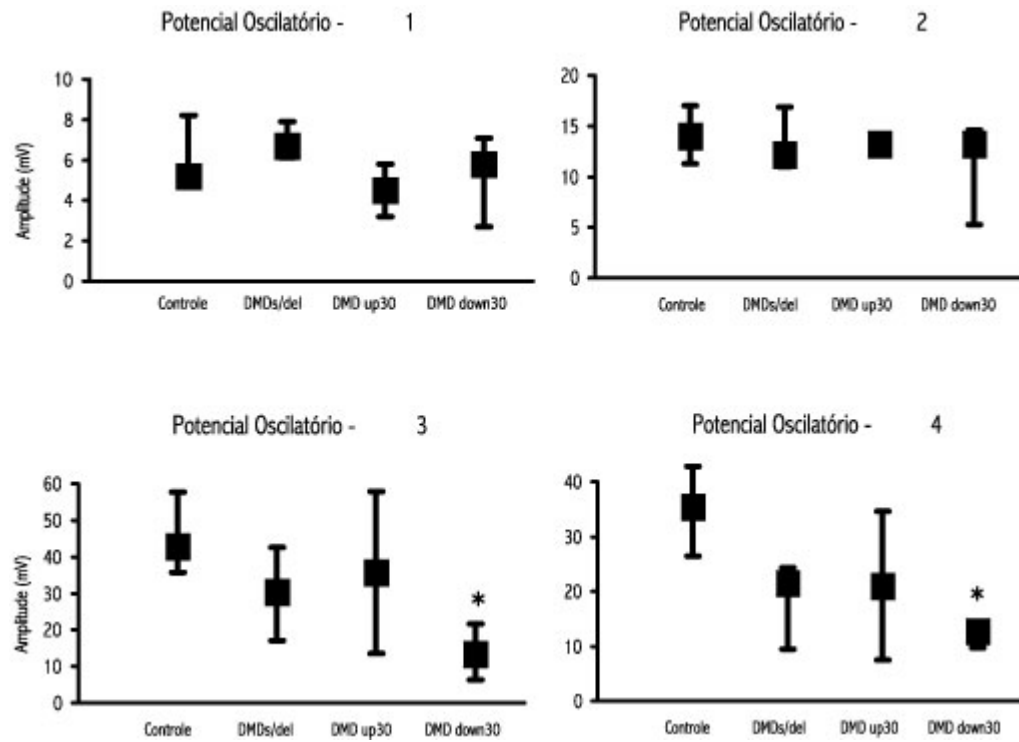


Figura 23: valores de mediana da razão da amplitude dos potenciais oscilatórios. As barras indicam os quartis de 25% e 75%. A diferença estatística foi significativa entre controles de DMD com deleção posterior ao exon 30 para os potenciais oscilatórios 3 e 4. Este resultado mostra que tanto a camada plexiforme externa da via dos bastonetes quanto a camada plexiforme interna da via dos cones têm sua função prejudicada pela alteração da distrofina.

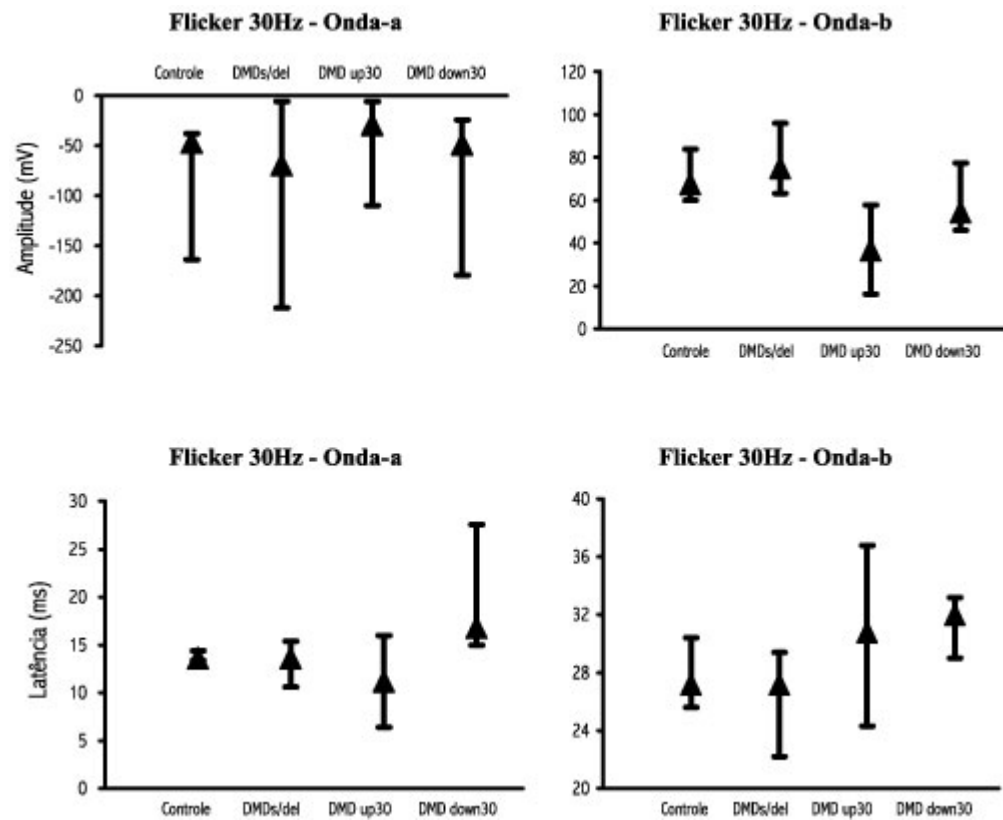


Figura 24: valores de mediana da amplitude (superior) e latência (inferior) da onda-a (coluna da esquerda) e da onda-b (coluna da direita) para a resposta de cones isolados por frequência temporal. As barras indicam os quartis de 25% e 75%. Não observamos diferença estatística entre controles e sujeitos com DMD.

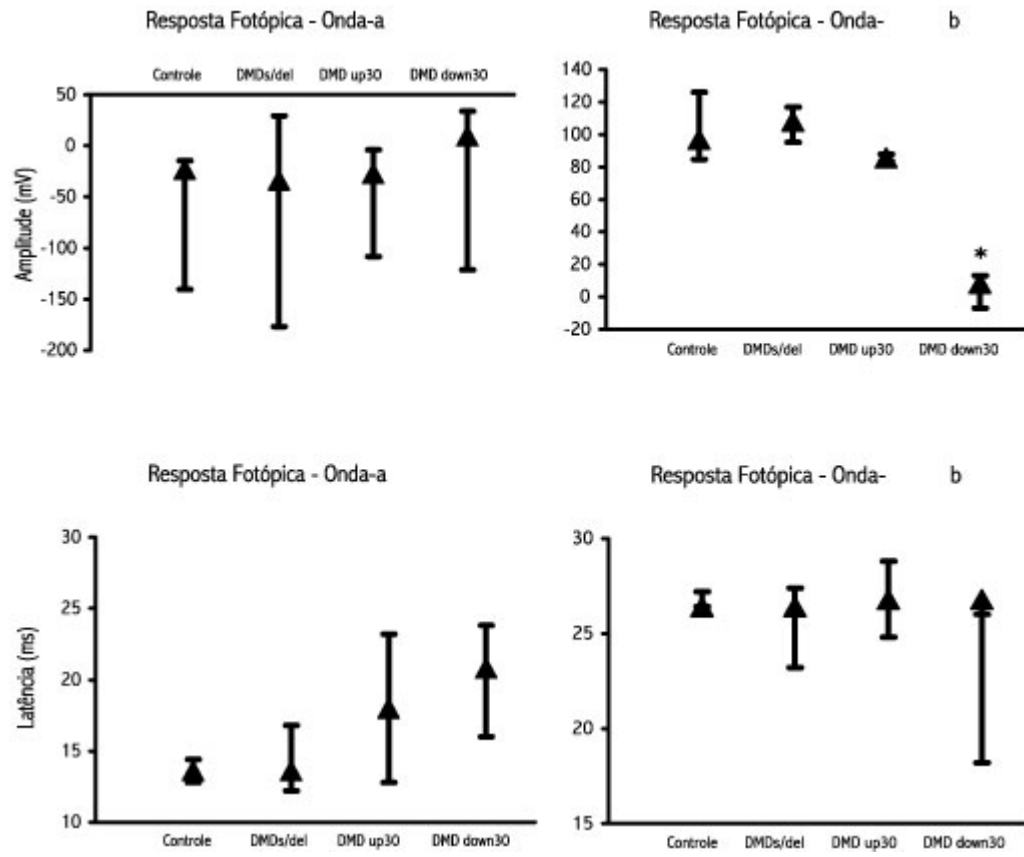


Figura 25: valores de mediana da amplitude (superior) e latência (inferior) da onda-a (coluna da esquerda) e da onda-b (coluna da direita) para a resposta dos bastonetes. As barras indicam os quartis de 25% e 75%. Diferença estatística entre controles de DMD com deleção posterior ao exon 30 foi obtida para a amplitude da onda-b.

Realizamos duas análises das medidas dos potenciais oscilatórios. Na primeira análise, a soma dos POs mostrou uma diferença estatística entre o grupo controle e o grupo 3 dos DMD (Kruskal-Wallis, $p < 0,024$; Dunn PostHoc Multicomparison Test). A análise da amplitude e da latência de cada PO foi realizada individualmente, uma vez que cada POs, aparentemente, tem uma origem celular diferente. Não foi observada diferença estatística no primeiro PO para a amplitude (Kruskal-Wallis, $p < 0,468$; Dunn PostHoc Multicomparison Test), nem para a latência (Kruskal-Wallis, $p < 0,079$; Dunn PostHoc Multicomparison Test) entre o grupo controle e os grupos de DMD. Resultado semelhante foi obtido para a amplitude (Kruskal-Wallis, $p < 0,981$; Dunn PostHoc Multicomparison Test) e para a latência (Kruskal-Wallis, $p < 0,899$; Dunn PostHoc Multicomparison Test) do segundo PO.

Entretanto, uma diferença estatística foi encontrada para a amplitude do terceiro (Kruskal-Wallis, $p < 0,034$; Dunn PostHoc Multicomparison Test) e quarto POs (Kruskal-Wallis, $p < 0,018$; Dunn PostHoc Multicomparison Test) entre o grupo 3 e os controles. Para a medida da latência do terceiro (Kruskal-Wallis, $p < 0,405$; Dunn PostHoc Multicomparison Test) e do quarto PO (Kruskal-Wallis, $p < 0,559$; Dunn PostHoc Multicomparison Test) todos os grupos de DMD apresentam resultados semelhantes aos dos controles. Todos estes resultados estão apresentados na figura 26.

Na medida da função de cones para respostas ao flicker 30Hz, não foram obtidas diferenças estatísticas entre os controles e os grupos de DMD para o parâmetro amplitude (Kruskal-Wallis, $p < 0,257$; Dunn PostHoc Multicomparison Test) nem para o parâmetro latência (Kruskal-Wallis, $p < 0,190$; Dunn PostHoc Multicomparison Test) da onda-a. Resultado que se repetiu para a amplitude (Kruskal-Wallis, $p < 0,238$; Dunn PostHoc

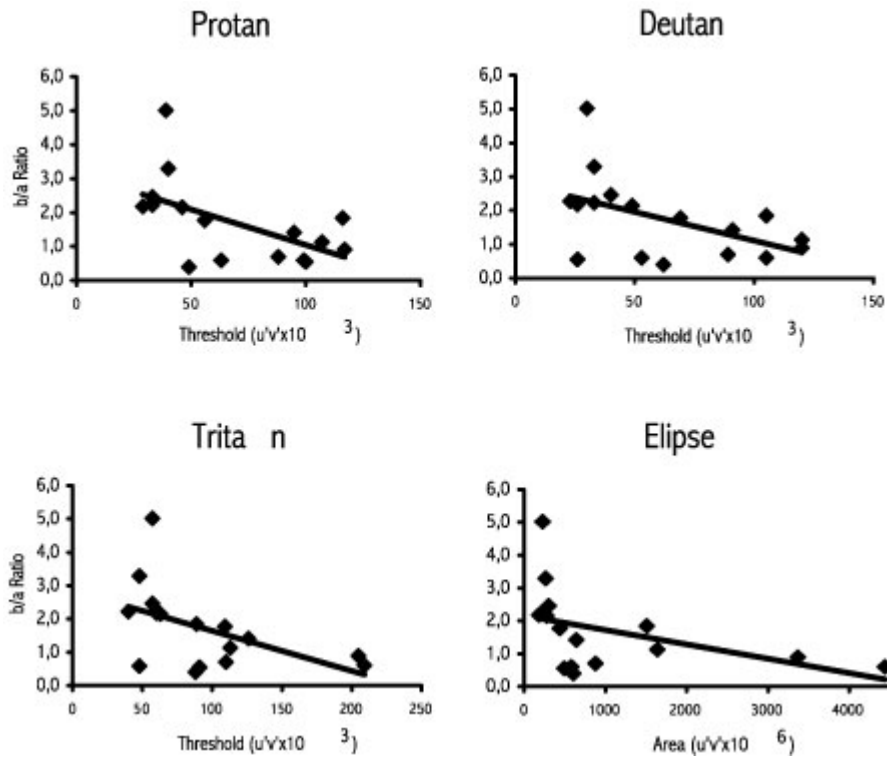


Figura 26: curva de dispersão dos valores da razão da amplitude da onda-b/ onda-a e dos valores obtidos nos testes de visão de cores. Valores negativos de correlação moderada a alta, estatisticamente significante, foram encontrados para o eixo protan ($R^2 = -0.66$, $p = 0.004$); para o eixo deutano ($R^2 = -0.51$, $p = 0.032$); para o eixo tritan ($R^2 = -0.58$, $p = 0.013$) do teste Trivector e para a elipse ($R^2 = -0.72$, $p < 0.001$). Estes resultados mostram que há uma relação inversa entre os limiares de discriminação dos testes de cores e os resultados da razão b/a do ERG, indicando que quanto menor o limiar nos testes de cores (melhor discriminação) maior a relação b/a.

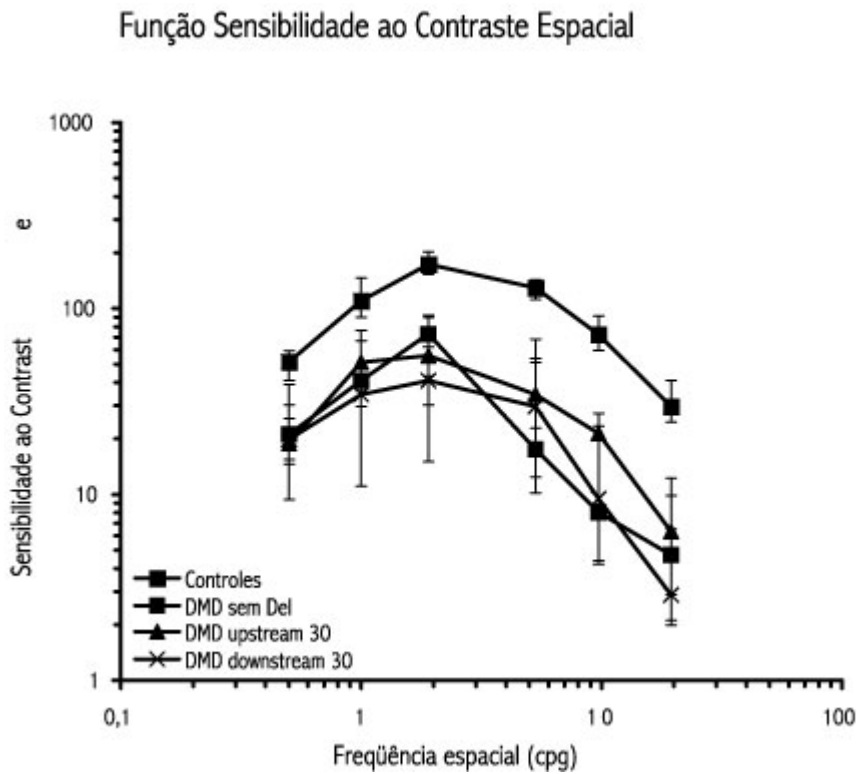


Figura 27: gráfico da função de sensibilidade ao contraste de luminância para estímulos com modulação espacial. Os valores são expressos em mediana e quartis (25% e 75%). A diferença entre o grupo controle e os sujeitos com DMD que ocorre para todas as frequências espaciais tem diferença estatística.

Multicomparison Test) e latência (Kruskal-Wallis, $p < 0,413$; Dunn PostHoc Multicomparison Test) da onda-b (figura 27).

Não observamos diferença estatística da amplitude (Kruskal-Wallis, $p < 0,134$; Dunn PostHoc Multicomparison Test) e da latência (Kruskal-Wallis, $p < 0,159$; Dunn PostHoc Multicomparison Test) da onda-a entre os grupos de DMD e os controles para a resposta de cones adaptados à luz (figura 28). Entretanto a amplitude da onda-b mostrou-se diferente entre os controles e os DMD do grupo 3 (Kruskal-Wallis, $p < 0,024$; Dunn PostHoc Multicomparison Test). A latência da onda-b não mostrou diferença entre os grupos de DMD e os controles (Kruskal-Wallis, $p < 0,321$; Dunn PostHoc Multicomparison Test).

Realizamos uma correlação entre os valores da relação b/a com os valores de limiar de discriminação do teste trivector e da área da elipse, obtidos no teste de visão de cores. O resultado mostrou uma relação inversa moderada significativa entre os parâmetros dos testes de visão de cores no teste Trivector para o eixo protan ($R^2 = -0.66$, $p = 0.004$); para o eixo deután ($R^2 = -0.51$, $p = 0.032$) e para o eixo tritan ($R^2 = -0.58$, $p = 0.013$). No teste da elipse, houve uma alta correlação ($R^2 = -0.72$, $p < 0.001$) (figura 29).

Função de Sensibilidade ao Contraste Temporal

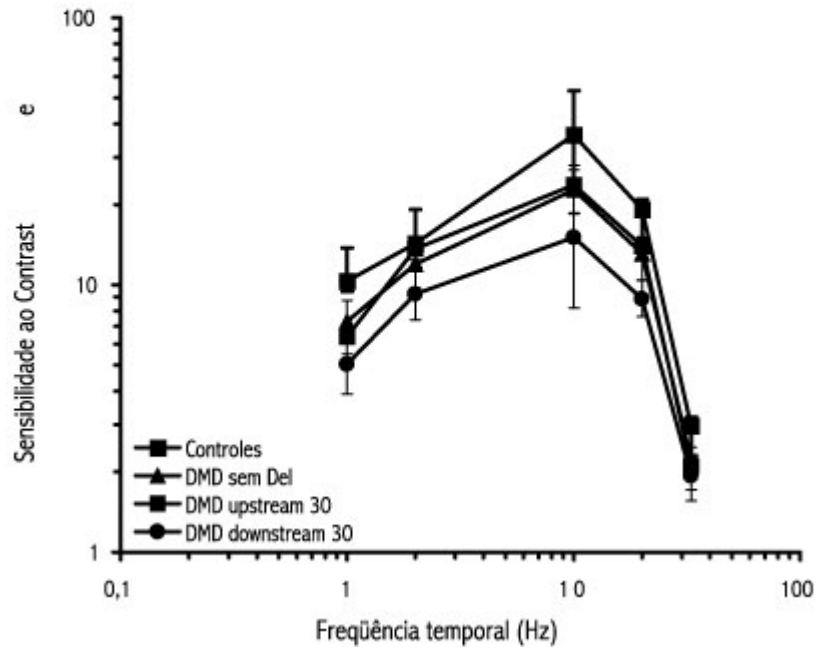


Figura 28: gráfico da função de sensibilidade ao contraste de luminância para estímulos com modulação temporal. Os valores são expressos em mediana e quartís (25% e 75%). A redução da sensibilidade observada entre o grupo controle e os sujeitos com DMD do grupo 3, que ocorre para todas as frequências temporais têm diferença estatística, exceto para a frequência 33Hz.

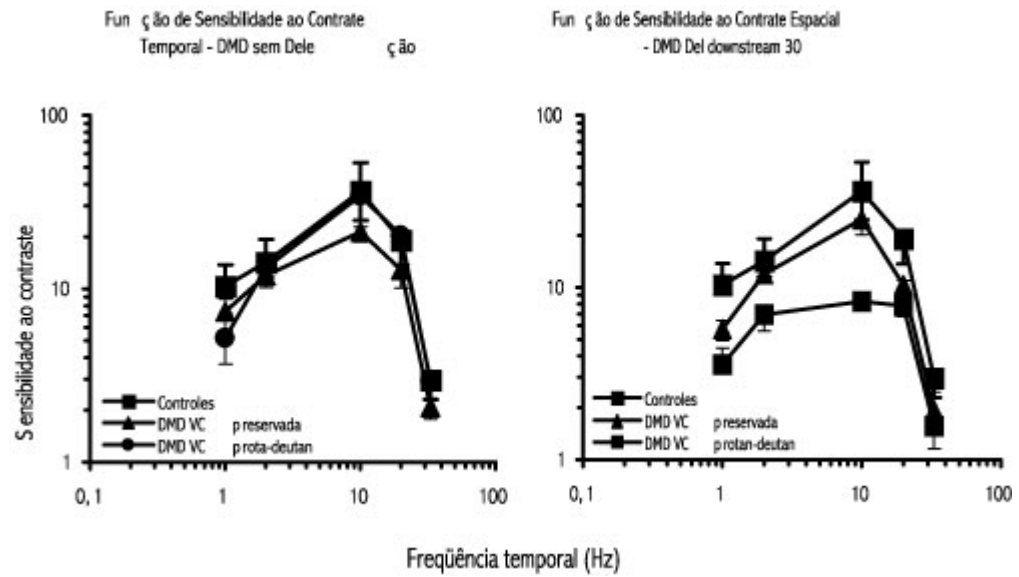


Figura 29: gráfico da função de sensibilidade ao contraste de luminância para estímulos com modulação temporal para os sujeitos separados de acordo com o resultado da visão de cores. À esquerda, os sujeitos DMD do grupo 1 e à direita, os sujeitos DMD do grupo 3. Os valores são expressos em mediana e quartís (25% e 75%). A diferença é estatisticamente significativa entre o grupo controle e os sujeitos com alteração na discriminação cromática somente para o grupo 3 (esquerda).

V. Discussão

Segundo o trabalho de Sigismund *et al.* (1994) as funções visuais de acuidade visual de Snellen, motilidade ocular e visão de cores nos sujeitos com DMD estavam dentro dos parâmetros de normalidade. A visão de cores também já havia sido previamente investigada nos sujeitos com DMD com os testes de pranchas e de ordenação. Os resultados estavam dentro da normalidade e na época se constatou pouca probabilidade de visão de cores e DMD ocorrerem no mesmo sujeito (Zatz *et al.*, 1974; Skinner, Smith & Emery, 1974; Gisburg & Long, 1977; Sigismund *et al.*, 1994). Estes foram os únicos trabalhos que encontramos na literatura, os quais avaliaram funcionalmente a visão dos sujeitos com DMD.

Nossos resultados são inéditos, até onde sabemos, em mostrar uma alta ocorrência de prejuízos na discriminação cromática e de contrastes de sujeitos com DMD. A perda destas funções foram significativamente maiores nos sujeitos com deleções downstream ao exon 30, a partir do qual se inicia a transcrição da isoforma retiniana Dp260. Nossos dados também replicaram os achados da literatura que mostram existir alterações nas respostas escotópicas e fotópicas do ERG de campo total. Como esta isoforma é localizada na retina entre fotorreceptores e células bipolares, na camada plexiforme externa, o dano observado na visão de cores e de contraste deve estar ligado à comunicação entre os fotorreceptores e estes neurônios de segunda ordem, assim como se acredita ser esta região o sítio da alteração encontrada no ERG.

V.1. Visão de Cores

Encontramos uma alta incidência de defeito de visão de cores para o eixo verde-vermelho em nossos sujeitos cuja deleção era downstream ao exon 30 (52%) e nos sujeitos que não apresentam deleção (35%). Este alto valor de defeitos de visão de cores supera, em muito, a incidência populacional geral. Os defeitos congênitos protanópicos e deuteranópicos são de origem genética ligados ao cromossomo X, e portanto, com muito maior prevalência em sujeitos do sexo masculino. Estes defeitos ocorrem em aproximadamente 4 a 10% da população geral (Pokorny *et al.*, 1981). Um valor próximo a esse (16%) foi obtido nos sujeitos com DMD do grupo 2 – deleção upstream ao exon 30 – mostrando que o único caso encontrado neste grupo está próximo do esperado para a população geral, podendo este valor ser reduzido se avaliarmos um número maior de sujeitos deste grupo.

A seletividade para a via parvocelular, mediadora da resposta para o eixo protan-deutan, nos traz importantes questões a serem respondidas referentes ao entendimento do mecanismo de funcionamento da distrofina na retina. Não sabemos se existe distrofina em todos os tipos de fotorreceptores. Existiria somente em cones L e M, cujo gene da opsina que os diferencia também se localiza no braço longo do cromossomo X? Poderia existir alguma interação entre o gene da distrofina, e os genes das opsinas dos cones M e L, mesmo estando eles em pontos distantes do cromossomo X? Por outro lado, parte do mecanismo poderia estar na retina interna, num funcionamento alterado das células ganglionares. Como a distrofina é encontrada no endotélio dos vasos sanguíneos da retina, e as alterações nessa proteína causam um comprometimento nesses vasos, seria compreensível encontrar perda de função em células ganglionares, cujo metabolismo é

mais diretamente afetado pela rede vascular que o de outras células retinianas. Esta hipótese seria plausível se apenas a via parvocelular estivesse comprometida nos pacientes com DMD, pois as células ganglionares que a compõem são muito pequenas e têm os axônios mais finos de todos os tipos de células ganglionares (Xu *et al.*, 2001). De fato, quando estudamos a visão de cores, vemos que a via koniocelular não parece estar afetada. Entretanto, a hipótese não se sustenta ao lembrarmos os achados de Benoff *et al.* (2002) mostrando que somente a via magnocelular do tipo ON está afetada em pacientes com DMD. Esta via é composta de axônios de calibre grosso e talvez fosse menos sujeita aos prejuízos vasculares. De qualquer forma, não se entenderia como esses prejuízos atingiriam duas vias (magno e parvo) e poupariam a terceira (konio). A conclusão desta especulação é a de que a hipótese mais provável para o mecanismo responsável pelas perdas visuais na DMD é a de que ele esteja localizado na retina externa.

A presente descoberta de uma associação entre DMD e cegueira para cores em cerca de 50% dos afetados, ou seja, muito mais freqüente do que constava da literatura, certamente surpreenderá a área de estudos de DMD pois a busca por esse tipo de ligação parou nos anos 70, segundo o que pudemos verificar. Naquela época foram escritos apenas três artigos sobre o assunto. Publicados simultaneamente em 1974, os estudos da brasileira Mayana Zatz *et al.* e de um grupo na Escócia que estudou DMB (Skinner *et al.*, 1974) tiveram impacto na área, o terceiro, um relato de caso, não recebeu citações (Gisburg, & Long, 1977). O estudo de Mayana Zatz *et al.* (1974) encontra uma pequena probabilidade de associação entre Duchenne e perdas congênitas de visão de cores devidas aos cones L e M na população masculina. No entanto, os autores verificaram uma maior possibilidade de que esta associação ocorra com sujeitos portadores de DMB. O

outro estudo é mais enfático neste achado e estabelece uma ligação entre DMB e defeitos deutan (Skinner et al., 1974). Esta distinção entre DMD e DMB foi feita pelos autores porque na época, acreditava-se que as alterações genéticas que levavam a uma ou outra doença ocorriam em locais diferentes no gene. Como em 1984 (v. Zatz, 2002) descobriu-se que os genes da DMD e DMB são alelos, as diferenças, encontradas por estes autores poderiam estar refletindo a influência de outras funções, cognitivas ou motoras, e não as funções visuais.

A discrepância entre os nossos resultados e os resultados obtidos nestes estudos pode estar refletindo a sensibilidade dos testes. Verificamos em nossos sujeitos que pelos testes de pranchas as alterações estão entre 16% e 24%, uma porcentagem muito semelhante às que foram encontrada nestes estudos. Todavia, com a aplicação de testes mais sensíveis para a detecção de defeitos de visão de cores CCT e Anomaloscópio, este valor percentual sobe para 50%.

Temos em nossa amostra sujeitos sem deleções nos quais a DMD é causada por mutações difíceis de serem identificadas neste gene pelo seu tamanho, mas que também apresentaram déficits na discriminação de cor. O fato da visão de cores mostrar-se alterada nestes sujeitos deve estar associado ao fato de que essas mutações podem estar ocorrendo downstream ao exon 30, portanto, prejudicando a função da distrofina Dp260 e conseqüentemente, acarretando a alteração funcional que encontramos. A alta incidência de defeitos de visão de cores neste grupo, todavia, é muito similar à incidência observada nos sujeitos com deleção downstream ao exon 30. Se este grupo de sujeitos sem deleções, descaracterizado do ponto de vista genético para uma correlação entre genótipo-fenótipo apresenta tal semelhança na visão de cores, este achado nos leva a acreditar que os testes

de visão de cores (CCT e Anomaloscópio) poderiam ser utilizados como um indicador aos geneticistas, ou seja, sujeitos que apresentem tais defeitos na visão de cores teriam a probabilidade de 50% de apresentar pelo menos um ponto de mutação downstream ao exon 30. No entanto, estudos devem ser realizados neste sentido com vistas a testar esta nossa hipótese.

Schmitz *et al.* (1977a) mostraram que a relação entre a amplitude da onda-b e a amplitude da onda-a no eletrorretinograma, a relação b/a, era tanto menor quanto maior o número de exons deletados ou quanto mais distante era a deleção com relação ao exon 30. Para a função de visão de cores, uma relação entre o local da deleção e a magnitude do defeito parece não existir já que nos nossos sujeitos houve prejuízo da discriminação cromática independentemente das deleções serem no exon 30 ou imediatamente após ou ocorrem mais distantes, como por exemplo no exon 50. A correlação encontrada entre a área da elipse e o número de genes deletados necessita ser posteriormente confirmada. Indiretamente, estes resultados mostram que a isoforma da distrofina que ocorre na retina (Dp260) é essencial para a sua fisiologia e que ocorrerá um prejuízo funcional da visão caso ela esteja alterada.

Quadros benignos de DMD podem ocorrer mesmo com deleções de até 50% do tamanho gene, desde que ela ocorra na região central do gene. Esta deleção alteraria apenas a região do bastão e não as regiões N- e C-terminal que são importantes sítios de ligação da distrofina com outras proteínas celulares (Zatz, 2002). A distrofina Dp260 é também uma proteína de tamanho grande e difere das isoformas maiores, de tamanho total, apenas por não ter a região N-terminal e aproximadamente 1/3 da região do bastão (Schmitz & Drenckhahn, 1997a; Mehler, 2000). Alterações nas regiões rica em cisteína e

C-terminal ocorrem quando a deleção é downstream ao exon 63. Sendo assim, deleções que ocorram na região central do gene podem levar a alterações retinianas e funcionais da visão, mesmo com quadros motores menos graves. Os sujeitos de nossa amostra apresentam deleções apenas na região do bastão, visto que as deleções se estendem, no máximo, até o exon 60. Este dado sugere que a região do bastão é importante para o papel fisiológico que desempenha a isoforma Dp260.

Com relação aos métodos de análise da capacidade de discriminação cromática, constatamos que a análise do tipo de defeito e do seu respectivo grau de acometimento, realizada pelo teste de cores de Cambridge, é complexa e deve considerar os resultados obtidos tanto no Trivector quanto no teste da elipse. Em alguns casos, o Trivector foi capaz de demonstrar apenas a existência de um prejuízo na discriminação para o eixo protan-deutan. Nestes sujeitos, só foi possível caracterizar o tipo de defeito analisando os resultados do Trivector em associação com os da elipse. Os resultados classificatórios que obtivemos no teste de Cores de Cambridge diagnosticando defeitos protan ou deutan foram confirmados em 98% os casos pelos resultados obtidos no Anomaloscópio de Neitz tipo I, teste padrão ouro para a detecção, classificação e quantificação de defeitos na visão de cores para o eixo protan-deutan.

A metodologia psicofísica rigorosa que o teste de Cores de Cambridge emprega a calibração exata dos estímulos e os controles de luminância e contorno com os quais é construído, garantem um procedimento muito preciso e tornam este teste comprovadamente (Ventura *et al.*, 2003 a e b; Castelo-Branco *et al.*, 2004) mais sensível do que os testes clássicos de ordenação (Farnsworth-Munsell 100-Hue), e de pranchas (Ishihara e AO H-R-R) tendo nos permitido uma análise mais refinada da função visual

de cores destes sujeitos. Com a bateria de testes utilizada, não só identificamos a existência de perdas na discriminação cromática como fomos capazes de mostrar que estas perdas são seletividade para uma das vias neurais do processamento da informação visual de cor – a via parvocelular, mediada pelos cones L e M.

V.2. Sensibilidade ao Contraste

O presente estudo apresenta os primeiros dados de sensibilidade ao contraste obtidos em pacientes com DMD. A única informação que encontramos na literatura sobre a visão espacial de sujeitos com DMD foi a do trabalho de Sigismund *et al.* (1994), que avaliou a acuidade visual de 20 sujeitos, tendo concluído que todos tinham acuidade visual normal. Este resultado foi por nós confirmado. Apesar de a AV ser normal, a sensibilidade ao contraste espacial dos sujeitos com DMD em nosso estudo revelou-se menor que a dos controles para toda a faixa de frequências espaciais que testamos, de 0.2 a 20 cpg. Ou seja, sujeitos com DMD necessitam de maiores níveis de contraste que controles para detectar a presença de uma grade espacial. Entretanto, sua resolução em alto contraste, isto é, sua acuidade visual, não difere da dos normais.

O fato de a sensibilidade ao contraste ser homogeneamente mais baixa que a dos controles para todas as frequências espaciais é importante para o entendimento do papel fisiológico da distrofina, uma vez que as respostas para as baixas frequências espaciais são relacionadas com a atividade de células magno e, as respostas para as altas frequências espaciais com a atividade das células parvo. As respostas para as frequências espaciais médias estariam relacionadas com as células konio. No entanto, estudos sobre as propriedades de resposta destas células para os diferentes estímulos mostram que existe

uma grande sobreposição entre as respostas das células konio com as respostas das células magno e parvo. Elas exibem campos receptivos de vários tamanhos: de grande como os de células magno a pequenos como de células parvo. Sendo assim, a redução da sensibilidade ao contraste encontrada para as frequências médias pode não estar relacionada diretamente com a via konicelular (Casagrande, 1994; Dacey & Lee, 1994; Komatsu, 1998; Xu *et al.*, 2001). Como os cones L e M participam tanto da via magnocelular como da via parvocelular e a Dp260 se localiza nos cones, esperar-se-ia de fato que alterações nessa proteína afetassem as duas vias. Nosso resultado se alinha com essa hipótese. Entretanto, o resultado obtido por Benoff (2001) mostra efeitos deletérios da DMD apenas na via magnocelular.

A participação dos cones S na detecção de níveis de luminância para estímulos com variação espacial é praticamente nula (Kaiser & Boynton, 1996). Assim, esta redução generalizada da curva de sensibilidade ao contraste se somaria aos resultados de visão de cores indicando alteração na função dos cones L e M provocada pela distrofina alterada, o que nos leva a concluir que a alteração observada para ambas as funções, cor e contraste, tem origem no início do processamento neural da informação na retina, já que Dp260 se localiza na camada plexiforme externa.

Embora não haja diferença estatística entre os resultados de sensibilidade ao contraste para os subgrupos sem defeito na visão de cores, após a divisão realizada nos grupos de DMD 1 e 3, os dados indicam que os sujeitos que apresentaram valores mais altos nos resultados no teste de visão de cores (pior discriminação) também apresentam uma tendência de ter valores menores nos resultados da sensibilidade ao contraste espacial de luminância (pior sensibilidade). Para o grupo 3 que é caracterizado do ponto

de vista genético, a alteração concomitante destas duas funções corrobora o raciocínio apresentado no parágrafo anterior. Para o grupo 1, cujos sujeitos não apresentam deleções, tais resultados poderiam indicar que possíveis pontos de mutação estão ocorrendo downstream ao exon 30.

A constatação de uma redução significativa, na sensibilidade ao contraste espacial de luminância, de 30 dB relativa aos valores do grupo controle, tem uma importância clínica fundamental porque a avaliação clínica da função visual espacial ainda é classicamente realizada somente pela medida da acuidade visual. Por este motivo, até o momento os sujeitos com distrofia muscular de Duchenne são referidos como tendo visão normal (Sigesmund *et al.*, 1994). A acuidade visual é apenas uma parte da função de visão espacial e expressa, apenas, a capacidade de observar dois estímulos minimamente separados no espaço, em situação de contraste máximo. No entanto, no ambiente em que vivemos, nas situações do nosso dia-a-dia, são poucos os estímulos que realmente apresentam contraste máximo. A grande maioria dos estímulos de nossa cena visual ocorre em níveis muito variados de contraste, tanto próximos como menores que o máximo. Assim, a função de sensibilidade ao contraste nos oferece uma quantidade muito maior de informação a respeito de sua visão espacial do que a AV, uma vez que esta função leva em consideração a capacidade de perceber estímulos separados no espaço, incluindo a variação do nível de contraste nesta medida.

A sensibilidade ao contraste também foi testada para estímulos com modulação temporal permitindo a avaliação da capacidade de perceber diferenças para estímulos que variam no tempo. No paradigma que utilizamos, a sensibilidade ao contraste estava reduzida apenas nos sujeitos com DMD e deleção downstream ao exon 30 – grupo 3.

Interessante foi o resultado obtido quando os grupos foram separados seguindo os mesmos critérios da sensibilidade ao contraste espacial. Os sujeitos do grupo 3, que apresentaram alterações na visão de cores para o eixo protan-deutan, tiveram uma redução uniforme significativa da sensibilidade ao contraste por modulação temporal quando comparados com sujeitos do subgrupo sem defeito na visão de cores e com os normais. Este resultado difere do encontrado na medida por modulação espacial, já que o grupo 1, mesmo após a divisão, não apresentou diferenças entre os dois subgrupos com relação ao grupo controle. Embora os cones S participem das respostas às baixas frequências temporais, esta participação é inferior à dos cones L e M. Sendo assim, os nossos resultados indicando valores reduzidos de sensibilidade ao contraste temporal concordam com os encontrados na visão de cores e na sensibilidade ao contraste espacial e contribuem para nossa sugestão de que, principalmente os cones L e M são alterados pela deleção downstream ao exon 30. A dicotomia das respostas nas duas principais vias de processamento visual – parvo e magnocelular – também pode ser analisada pelas suas distintas características de respostas temporais. As células que compõem a via magnocelular respondem preferencialmente a estímulos de rápida modulação – igual ou acima de 10 Hz – enquanto que as células da via parvocelular, respondem preferencialmente a estímulos de baixa modulação temporal – pouco além de 1 Hz (Leonova, Pokorny & Smith, 2003). Outra vez, observamos que ambas as vias de processamento estão afetadas de maneira semelhante, já que os nossos resultados de sensibilidade ao contraste temporal foram igualmente reduzidos para a frequência temporal baixa -1 Hz - e para as altas que testamos - acima de 10 Hz. Esta redução difusa da sensibilidade ao contraste temporal reforça nossa sugestão anterior de que o sítio

destas alterações esteja no nível da retina externa, no que há de comum aos sistemas magno e parvo, ou seja, os fotorreceptores L e M. Acreditamos que a semelhança da resposta entre os controles e os sujeitos com DMD para a frequência temporal máxima usada, de 33Hz, ocorra por esta ser uma frequência próxima da frequência crítica de fusão – limiar para estímulos modulados temporalmente na qual se deixa de perceber os estímulos como um piscar intermitente e passa-se a ver como um estímulo constante. Por se tratar de uma frequência na extremidade da curva não há grande possibilidade de uma variação dos níveis de contraste normalmente discriminados não sendo possível mostrar diferenças entre os grupos uma vez que o próprio limiar dos sujeitos normais é alto e apresenta pouca variação.

Comparando os resultados obtidos nas medidas de sensibilidade ao contraste espacial e temporal, notamos que as características espaciais parecem estar mais afetadas que as medidas temporais já que na função temporal, somente os sujeitos do grupo 3, os quais têm uma visão de cores alterada, apresentam redução significativa. Nos sujeitos deste mesmo grupo com boa visão de cores e nos sujeitos dos outros grupos de DMD, o contraste temporal se mostrou alterações. Todavia, apesar da redução da sensibilidade ao contraste espacial ter sido verificada em todos os grupos de DMD, foi observada uma tendência desta redução ser maior nos sujeitos com DMD do grupo 3 (v. figura 29).

O resultado das medidas de ambas as funções de sensibilidade ao contraste em associação com os obtidos nos testes de visão de cores aponta fortemente para uma correlação genótipo-fenótipo para as funções visuais estudadas, já que os sujeitos com DMD e deleção downstream ao exon 30 são os que apresentam os resultados mais alterados para todos os testes. Isto indica, mais uma vez, que a distrofina retiniana

(Dp260) tem um papel fisiológico extremamente importante para garantir uma boa visão. Os sujeitos cuja deleção ocorre downstream ao exon 30 apresentam perdas de importantes funções visuais. Estes resultados reforçam as conclusões a que chegamos analisando os achados nos testes de visão de cores, apontando para a retina externa, como o sítio de origem das alterações das funções visuais que testamos.

Vemos, portanto, que os sujeitos com distrofia muscular de Duchenne apresentam prejuízo das funções de discriminação de cores e de aspectos visuais, espaciais e temporais do sistema visual. Estas alterações podem dar suporte para as, até então, especulativas alterações neurocomportamentais e cognitivas, que Mehler (2000) propôs tendo em vista apenas as alterações retinianas observadas no eletrorretinograma.

Finalmente, as alterações identificadas são de extrema relevância, pois têm uma implicação direta nos âmbitos pedagógicos e reabilitacionais. Com a evolução dos tratamentos clínicos e com o advento da terapia genética (Matsuo, 1996), a sobrevivência destes sujeitos deve se prolongar e, conseqüentemente, conhecer mais sobre todos os aspectos desta doença nos permitirá planejar melhor estratégias a fim de garantir a melhor qualidade de vida possível para os sujeitos com DMD.

V.3. Eletrorretinograma

Alterações no eletrorretinograma de campo total são descritas na literatura e em tais resultados de função retiniana, tanto a resposta mediada por cones (Fitzgerald *et al.*, 1994; Pillers *et al.*, 1999a; Schmitz *et al.*, 1997a) quanto a resposta mediada por bastonetes (D'Souza *et al.*, 1995; Pillers *et al.*, 1993a; Yang *et al.*, 2001) parecem estar afetadas nos sujeitos com DMD.

Nossos dados confirmaram estes previamente encontrados na literatura, uma vez que nos sujeitos que avaliamos também encontramos alterações tanto nas respostas escotópicas que refletem a função dos bastonetes, quanto nas respostas fotópicas, mediadas por cones. Na resposta dos bastonetes observamos uma redução na amplitude da onda-b e um aumento de sua latência quando comparamos os resultados dos controles com o resultado dos sujeitos com DMD e deleção downstream ao exon 30 (grupo 3), o exon responsável pela transcrição da isoforma retiniana Dp260. Nossos dados mostraram também um aumento na latência da onda-a que reflete a atividade dos fotorreceptores. Uma vez que a geração da onda-b ocorre no processamento pós-receptoral e que a Dp260 apresenta um importante papel fisiológico na propagação da resposta do fotorreceptor para os neurônios de segunda ordem, o atraso provocado pela alteração na distrofina neste sítio pode prolongar o tempo de surgimento da resposta da onda-b. Neste caso, como medimos a latência no pico da resposta de amplitude, este aumento da latência da onda-a, na verdade, reflete mais um atraso na geração da onda-b do que um evento alterando a resposta do próprio fotorreceptor.

Para a resposta máxima da retina, envolvendo as duas classes de fotorreceptores, cones e os bastonetes, os sujeitos com DMD e deleção downstream ao exon 30, apresentaram uma redução na amplitude da onda-b e um aumento de sua latência, confirmando os achados encontrados na literatura (Fitzgerald *et al.*, 1994; Pillers *et al.*, 1999a; Pillers *et al.*, 1993a; Yang *et al.*, 2001). Estes trabalhos também apontam para uma redução na razão das amplitudes das ondas b/a. A redução da razão b/a reflete uma alteração na transmissão do sinal entre os fotorreceptores e as células bipolares. Os sujeitos com DMD que avaliamos apresentaram uma redução da razão b/a cujos valores

foram progressivamente pior para os sujeitos com DMD sem deleção, seguidos pelos sujeitos com deleção upstream ao exon 30 e, apresentando os menores valores de razão b/a, os sujeitos com DMD e deleção downstream ao exon 30.

Como já mencionado na seção de Resultados, a razão da amplitude b/a se correlaciona inversamente com os resultados obtidos em todos os parâmetros do teste de visão de cores (Trivector e elipse) o que nos leva a concluir que a alteração encontrada na discriminação cromática está intimamente ligada com a alteração retiniana causada pela distrofina. Esta correlação necessita ser posteriormente verificada também para as sensibilidades ao contraste de luminância espacial e temporal já que foi pequeno o número de sujeitos (n= 6) que realizam tanto o exame do ERG como a medição da função de sensibilidade ao contraste.

Dentre os estudos que analisaram o ERG de pacientes com DMD, não encontramos uma análise individual dos potenciais oscilatórios. Julgamos ser extremamente importante porque, por esta análise individual dos potenciais oscilatórios, podemos identificar quais as regiões ou os agrupamentos celulares da retina que estão mais afetados pelas alterações na distrofina. Este tipo de análise pode ser realizado no eletrorretinograma de campo total por que cada potencial oscilatório tem sua origem em uma determinada camada da retina e reflete a resposta de um determinado agrupamento celular. Nossa análise individual dos potenciais oscilatórios mostrou que nos sujeitos com DMD do grupo 3, há uma redução na amplitude do terceiro PO. Estudos de isolamento de tipos celulares realizados com fármacos indicam que este potencial oscilatório reflete as alterações elétricas na camada plexiforme externa que ocorrem pela despolarização das células bipolares da via de processamento dos bastonetes (Wachtmeister, 1998). Estudos

realizando marcações celulares por métodos de imunocitoquímica, concluíram que a camada plexiforme externa é o sítio de maior concentração da distrofina na retina (v. revisão em Schmitz *et al.*, 1997a). Sendo assim, nossos dados eletrofisiológicos mostrando prejuízo funcional na retina externa estão de acordo com a localização das marcações histológicas da distrofina na retina nessa mesma região. O que não se pode precisar é se todos os tipos de cones contém distrofina ou se ela se encontra apenas nos cones L e M, porque as funções afetadas dizem respeito apenas a estes últimos.

O quarto potencial oscilatório, que reflete as alterações elétricas geradas pelas células ganglionares e pelas células interplexiformes existentes na camada plexiforme interna, relacionadas com a via OFF dos cones (Wachtmeister, 1998), também era de menor amplitude nos sujeitos com DMD do grupo 3 quando comparado com os controles. Esta redução no quarto PO indicaria uma alteração relacionada à via OFF e necessita de posterior investigação. Uma vez que a distrofina é fortemente marcada em toda a extensão do corpo celular das células de Muller e na membrana limitante interna (figura 4), alterações nestas regiões poderiam estar afetando o funcionamento adequado das células ganglionares. Neste caso, as alterações verificadas no 4º PO não estariam refletindo alterações especificamente da via OFF das células ganglionares como um todo.

As marcações histológicas na camada plexiforme externa indicam que a distrofina retiniana (Dp260) se localiza internamente na invaginação do terminal axonal do fotorreceptor. As células que fazem contato nesta região interna são pertencentes à via ON. Sendo assim, estas alterações no 4º PO não devem refletir a ação da Dp260 mas, talvez, das outras isoformas presentes na retina.

Habitualmente, os resultados dos potenciais oscilatórios são apresentados como um valor da soma de todos os potenciais e a latência para ocorrer o primeiro potencial (Girlanda *et al.*, 1997). Uma vez que podemos realizar uma avaliação mais detalhada dos potenciais oscilatórios, a análise da soma dos potenciais oscilatórios, que conseqüentemente está reduzida nos sujeitos com DMD do grupo 3, em comparação com os resultados dos controles, não nos é muito informativa.

A resposta obtida pela estimulação de flicker a 30Hz foi semelhante entre os sujeitos do grupo controle e os sujeitos com DMD. No entanto, podemos observar na figura 24 que para os sujeitos do grupo 3 há uma tendência destes apresentarem valores maiores de latência tanto para a onda-a quanto para a onda-b. Estudos Posteriores são necessários para testar esta tendência. Assim, estes resultados associados aos resultados obtido no teste de sensibilidade ao contraste temporal sugerem que as funções de processamento temporal estão menos afetadas do que as espaciais.

Por último, a resposta dos cones após adaptação à luz também estava alterada para os sujeitos com DMD do grupo 3. A amplitude da onda-b era menor nos sujeitos deste grupo quando comparado aos controles. Este resultado é semelhante ao encontrado em outros estudos (Fitzgerald *et al.*, 1994; Pillers *et al.*, 1999a; Schmitz *et al.*, 1997a).

Na discussão que fizemos com relação aos resultados obtidos na visão de cores indicando uma seletividade para os cones L e M, questionamos o desconhecimento sobre a dispersão da distrofina na retina, ou seja, se ela é disseminada por total a retina ou é expressa apenas nos cones L e M. A reduzida resposta obtida no ERG de campo total para estímulos escotópicos, mediada por bastonetes aponta fortemente na direção de uma expressão da distrofina espalhada em toda a retina e contra uma aparente seletividade aos

cones L e M. Se fosse este o caso, porque a distrofina iria deixar de ser transcrita apenas nos cones S? Muito provavelmente, os nossos dados estão apontando para uma associação entre os genes das opsinas L e M e o gene da distrofina, localizados no mesmo cromossomo.

Até o presente momento, todos os achados indicavam que a Dp260 é expressa principalmente nas células fotorreceptoras na região em que se conectam com células bipolares do tipo ON: marcações por imunocitoquímica mostram que a distrofina Dp260 se localiza na parte interna da invaginação do botão sináptico dos fotorreceptores, sítio de conexão com células bipolares do tipo ON; Benoff *et al.* (2002) em um estudo de potencial visual evocado separando as vias magnocelular e parvocelular, do tipo ON e OFF, mostraram que a via magnocelular do tipo ON está afetada em pacientes com DMD enquanto que as outras vias não; a principal alteração encontrada no ERG é a redução da amplitude da onda-b na resposta máxima e já está bem estabelecido que esta onda é gerada pelas células bipolares pertencentes à via ON (Brown, 1968; Fitzgerald, Cibis, Giambrone, & Harris, 1994; Fitzgerald *et al.*, 1999; Wachtmeister, 1987; Wachtmeister, 1998); a seletividade para as células do tipo ON foi confirmada em um estudo de ERG de longa duração (Fitzgerald, Cibis, Giambrone, & Harris, 1994) que permite a análise separada destas vias.

Finalmente, os nossos dados replicaram os dados da literatura e apontam para a existência de uma correlação genótipo-fenótipo no eletrorretinograma, assim como ocorreu para os testes psicofísicos. Acreditamos que uma análise mais detalhada dos potenciais oscilatórios, incluindo um número maior de sujeitos irá nos auxiliar no entendimento do fluxo de sinais neurais na retina destes sujeitos. A evidente alteração

retiniana demonstrada pelas alterações no eletrorretinograma destes sujeitos também nos leva a concluir que as alterações nas funções visuais decorrem da alteração retiniana que na camada plexiforme externa da retina, local onde se encontra a isoforma da distrofina Dp260.

VI. Conclusões

Como conclusões, nosso estudo mostrou que:

1 - existem prejuízos na capacidade de discriminação cromática nos sujeitos com DMD principalmente nos sujeitos com deleção downstream ao exon 30 pois apresentam resultados reduzidos para o eixo protan-deutan em um valor muito acima do esperado para a população normal;

2 – a sensibilidade ao contraste de luminância espacial e temporal encontram-se reduzidas para todas as frequências nos sujeitos com DMD, principalmente nos sujeitos deleção downstream ao exon 30 que apresentam os piores resultados;

3 - além das alterações descritas na literatura, referentes ao ERG de sujeitos com DMD, descrevemos pela primeira vez alterações do ERG nos potenciais oscilatórios PO3 e PO4. Os potenciais PO3 relacionam-se à resposta das células bipolares pertencentes à via de bastonetes e os PO4 refletem a atividade de células da camada plexiforme interna (células de Müller e ganglionares) pertencentes à via dos cones.

4 - tanto para a visão de cores quanto para as sensibilidades ao contraste e o eletrorretinograma, observamos a presença de uma correlação entre estes aspectos do fenótipo e o genótipo, já que estes resultados foram significativamente piores nos sujeitos com DMD que possuem deleção posterior ao exon 30.

VII. Referências Bibliográficas

Adams, R. J. & Courage, M. L. (2002). Using a single test to measure contrast sensitivity from early childhood to maturity. *Vision Res.*, *42*, 1205-1210.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Watson, J. D. (1989). *The molecular biology of the cell*. 2ª edição. Alberts *et al.*, (eds). Garland Publishing, Inc. New York, NY, USA.

Alho, C. S., Salzano, F. M., & Zatz, M. (1995). Analysis of deletions and their relationship with clinical severity, family recurrence, and intelligence in Duchenne and Becker muscular dystrophy patients from southern Brazil. *Brazilian Journal Of Genetics.*, *18* (4), 617-622.

Becker, P. E. (1957). Neue Ergebnisse der Genetik der Muskeldystrophien. *Acta genetica et statistica medica*. *7*, 303-310.

Benoff, K, Fitzgerald, K, Zemon, V, Pinkhasov, E, Gordon, J, & Cibis, G. (2001). Magnocellular ON-pathway deficits in Duchenne muscular dystrophy: A visual evoked potential study. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.*, *42*(4), S4218 Suppl.

Billard, C., Gillet, P., Barthez, M., Hommet, C., & Bertrand, P. (1998). Reading ability and processing in Duchenne muscular dystrophy and spinal muscular atrophy. *Dev.Med.Child Neurol.*, *40*, 12-20.

Blake, D. J. & Kroger, S. (2000). The neurobiology of Duchenne muscular dystrophy: learning lessons from muscle? *Trends in Neurosciences*, *23*, 92-99.

Bollinger, K., Sjoberg, S. A., Neitz, M., & Neitz, J. (2004). Topographical cone photopigment gene expression in deutan-type red-green color vision defects. *Vision Res.*, *44*, 135-145.

Bresolin, N., Castelli, E., Comi, G. P., Felisari, G., Bardoni, A., Perani, D. et al. (1994). Cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul.Disord.*, *4*, 359-369.

Brown, K. T. (1968). The electroretinogram: its components and their origins. *Vision Res.*, *8*, 633-677.

Brown, P. K. & Wald, G. (1964) Visual pigments in single rods & cones of human retina - direct measurements reveal mechanisms of human night & color vision. *Science* 144 (361), 45-47.

Casagrande, V. A. (1994) A third parallel visual pathway to primate area V1. *Trends Neurosci.*, 17, 305-310.

Castelo-Branco, M., Faria, P., Forjaz, V., Kozak, L. R., & Azevedo, H. (2004). Simultaneous comparison of relative damage to chromatic pathways in ocular hypertension and glaucoma: correlation with clinical measures. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.*, 45, 499-505.

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. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.*, 34, 3646-3652.

Conway, B. R. (2003). Colour vision: a clue to hue in V2. *Current Biology*, 13, 308-310.

Claudepierre, T., Dalloz, C., Mornet, D., Matsumura, K., Sahel, J., & Rendon, A. (2000a). Characterization of the intermolecular associations of the dystrophin-associated glycoprotein complex in retinal Muller glial cells. *J.Cell Sci.*, 113 Pt 19, 3409-3417.

Claudepierre, T., Mornet, D., Pannicke, T., Forster, V., Dalloz, C., Bolanos, F. et al. (2000b). Expression of Dp71 in Muller glial cells: A comparison with utrophin- and dystrophin-associated proteins. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.*, 41, 294-304.

Connors, N. C. & Kofuji, P. (2002). Dystrophin Dp71 is critical for the clustered localization of potassium channels in retinal glial cells. *Journal of Neuroscience*, 22, 4321-4327.

Cornsweet, T. M. (1970). *Visual Perception*. New York, NY, Academic Press.

Cotton, S., Crowe, S. F., & Voudouris, N. (1998). Neuropsychological profile in Duchenne muscular dystrophy. *Child Neuropsychology*, 4 (2), 110-117.

D'souza, V. N., Man, N. T., Morris, G. E., Karges, W., Pillers, D. A. M., & Ray, P. N. (1995). A Novel Dystrophin Isoform Is Required for Normal Retinal Electrophysiology. *Human Molecular Genetics*, 4, 837-842.

Dacey, D. M. & Lee, B. B. (1994). The 'blue-on' opponent pathway in primate retina originates from a distinct bistratified ganglion cell type. *Nature*, *367*, 731-735.

Dalloz, C., Sarig, R., Fort, P., Yaffe, D., Bordais, A., Pannicke, T. et al. (2003). Targeted inactivation of dystrophin gene product Dp71: phenotypic impact in mouse retina. *Hum.Mol.Genet.*, *12*, 1543-1554.

De Valois, R. L., Abramov, I., & Jacobs, G. H. (1966). Analysis of response patterns of LGN cells. *J.Opt.Soc.Am.*, *56*, 966-977.

De Valois, R. L., Jacobs, G. H., & Abramov, I., (1964). Responses of single cells in visual system to shifts in wavelength of light. *Science*, *146*, 1184-1186.

De Valois, R. L. & De Valois, K. K. (1993). A multi-stage color model. *Vision Res.*, *33*, 1053-1065.

Deeb, S. S., Hayashi, T., Winderickx, J., & Yamaguchi, Y. (2000). Molecular analysis of human red/green visual pigment gene locus: relationship to color. *Methods in Enzymology*, *316*, 651-670.

Di, L.V, Restuccia, D., Servidei, S., Nardone, R., Oliviero, A., Profice, P. et al. (1998). Functional involvement of cerebral cortex in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve*, *21*, 662-664.

Drenckhahn, D., Holbach, M., Ness, W., Schmitz, F., & Anderson, L. V. B. (1996). Dystrophin and the dystrophin-associated glycoprotein, beta-dystroglycan, co-localize in photoreceptor synaptic complexes of the human retina. *Neuroscience*, *73*, 605-612.

Essex, C. & Roper, H. (2001). Lesson of the week: late diagnosis of Duchenne's muscular dystrophy presenting as global developmental delay. *British Med. J.*, *323*, 37-38.

Fitzgerald, K. M., Cibis, G. W., Gettel, A. H., Rinaldi, R., Harris, D. J., & White, R. A. (1999). ERG phenotype of a dystrophin mutation in heterozygous female carriers of Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Medical Genetics*, *36*, 316-322.

Fitzgerald, K. M., Cibis, G. W., Giambrone, S. A., & Harris, D. J. (1994). Retinal Signal Transmission in Duchenne Muscular-Dystrophy - Evidence For Dysfunction in the

Photoreceptor Depolarizing Bipolar Cell Pathway. *Journal of Clinical Investigation*, 93, 2425-2430.

Fortina, P., Cheng, J., Shoffner, M. A., Surrey, S., Hitchcock, W. M., Kricka, L. J. et al. (1997). Diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy and quantitative identification of carrier status by use of entangled solution capillary electrophoresis. *Clin.Chem.*, 43, 745-751.

Girlanda, P., Quartarone, A., Buceti, R., Sinicropi, S., Macaione, V., Saad, F. A. et al. (1997). Extra-muscle involvement in dystrophinopathies: An electroretinography and evoked potential study. *Journal of the Neurological Sciences*, 146, 127-132.

Gisburg, C. M. & Long, C. G. (1977). Family in which Duchenne's muscular dystrophy and protan colour blindness are segregating. *Journal of Medical Genetics*, 14, 130-132.

Grahan, C. H. (1965) (ed). In *Vision and Visual Perception*. USA: New York, John Wiley & Sons.

Grover, S., Fishman, G. A., Anderson, R. J., Tozzatti, M. S. V., Heckenlively, J. R. Weleber, R. B. et.al. (1999). Visual acuity impairment in retinitis pigmentosa at age 45 years or older. *Ophthalmology*, 106, 1780-1785.

Hauser, M. A. & Chamberlain, J. S. (1996). Progress towards gene therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Endocrinology*, 149, 373-378.

Hawkins, J. D. (1996). *Gene structure and expression*. 3° ed. Cambridge University Press, New York, USA.

Hoffman, E. P., Brown, R. H. & Kunkel, L.H. (1987). Dysdystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*, 51, 929-938.

Howard, P. L., Dally, G. Y., Wong, M. H., Ho, A., Weleber, R. G., Pillers, D. A. et al. (1998). Localization of dystrophin isoform Dp71 to the inner limiting membrane of the retina suggests a unique functional contribution of Dp71 in the retina. *Hum.Mol.Genet.*, 7, 1385-1391.

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

Johnson, E. N., Hawken, M. J., & Shapley, R. (2004). Cone Inputs in Macaque Primary Visual Cortex. *J.Neurophysiol.*

Kaiser, P. K. & Boynton, R. M. (1996). In *Human Color Vision* (2 ed.). USA: Optical Society of America.

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

Komatsu, H. (1998). Mechanisms of central color vision. *Current Opinion Neurobiol.*, 8, 503-508.

Leonova, A., Pokorny, J., & Smith, V. C. (2003). Spatial frequency processing in inferred PC- and MC-pathways. *Vision Res.*, 43, 2133-2139.

Marks, W. B., Dobbelle, W. H., & Macnichol, E. F. (1964). Visual pigments of single primate cones. *Science*, 143 (361), 1181-1184.

Marmor, M. F., Holder, G. E., Seeliger, M. W., & Yamamoto, S. (2003). Standard for Clinical Electroretinography (2003 Update). <http://www.iscev.org/standards/pdfs/erg-standard-2003.pdf>.

Marsh, G. G. (1972). Impaired Visual-Motor Ability of Children with Duchenne Muscular-Dystrophy. *Perceptual and Motor Skills*, 35, 504-&.

Martin, P. R., White, A. J., Goodchild, A. K., Wilder, H. D., & Sefton, A. E. (1997). Evidence that blue-on cells are part of the third geniculocortical pathway in primates. *Eur.J.Neurosci.*, 9, 1536-1541.

Matsuo, M. (1996). Duchenne/Becker muscular dystrophy: From molecular diagnosis to gene therapy. *Brain & Development*, 18, 167-172.

Mechler, F. & Victor, J. D. (2000). Comparison of thresholds for high-speed drifting vernier and a matched temporal phase-discrimination task. *Vision Res.*, 40, 1839-1855.

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

Mollon, J. D. (1997). "... On the basis of velocity clues alone": some perceptual themes 1946-1996. *Q.J.Exp.Psychol.A*, 50, 859-878.

Mollon, J. D. (2003). Introduction. In J.D.Mollon, J. Pokorny, & K. Knoblauch (Eds.), *Colour and Defective Colour Vision* (1ed.). New York: Oxford University Press Inc.

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

Nathans, J., Piantanida, T. P., Eddy, R. L., Shows, T. B., & Hogness, D. S. (1986). Molecular genetics of inherited variation in human color vision. *Science*, 232, 203-210.

Neitz, J., Neitz, M., & Jacobs, G. H. (1993). More than three different cone pigments among people with normal color vision. *Vision Res.*, 33, 117-122.

Neitz, M. & Neitz, J. (2000). Molecular genetics of color vision and color vision defects. *Archives of Ophthalmology*, 118, 691-700.

Nobile, C., Marchi, J., Nigro, V., Roberts, R. G., & Danieli, G. A. (1997). Exon-intron organization of the human dystrophin gene. *Genomics*, 45, 421-424.

North, K. N., Miller, G., Iannaccone, S. T., Clemens, P. R., Chad, D. A., Bella, I. et al. (1996). Cognitive dysfunction as the major presenting feature of Becker's muscular dystrophy. *Neurology*, 46, 461-465.

O'Brien, K. F. & Kunkel, L. M. (2001). Dystrophin and muscular dystrophy: Past, present, and future. *Molecular Genetics and Metabolism*, 74, 75-88.

Palmer, S. E. (1999). Color Vision. In *Vision Science - Photons to Phenomenology* (1 ed., pp. 94-120). USA: MIT Press.

Pascual Pascual, S. I., Molano, J., & Pascual-Castroviejo, I. (1998). Electroretinogram in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Pediatr.Neurol.*, 18, 315-320.

Perlman, I. (1983). Relationship between the amplitudes of the b wave and the a wave as a useful index for evaluating the electroretinogram. *Br.J.Ophthalmol.*, 67, 443-448.

Phelan, J. K. (2000). Is the Duchenne Muscular Dystrophy gene also a X-linked Retinitis Pigmentosa locus?. *Mol.Genet.Methbol.*, 70, 81-83.

Pillers, D. A. M. (1999). Dystrophin and the retina. *Molecular Genetics and Metabolism*, 68, 304-309.

Pillers, D. A. H., Fitzgerald, K. M., Duncan, N. M., Rash, S. M., White, R. A., Dwinnell, S. J. et al. (1999a). Duchenne/Becker muscular dystrophy: correlation of phenotype by electroretinography with sites of dystrophin mutations. *Human Genetics*, 105, 2-9.

Pillers, D. A. M., Weleber, R. G., Green, D. G., Rash, S. M., Dally, G. Y., Howard, P. L. et al. (1999b). Effects of dystrophin isoforms on signal transduction through neural retina: Genotype-phenotype analysis of Duchenne muscular dystrophy mouse mutants. *Molecular Genetics and Metabolism*, 66, 100-110.

Pillers, D. M., Bulman, D. E., Weleber, R. G., Sigesmund, D. A., Musarella, M. A., Powell, B. R. et al. (1993a). Dystrophin expression in the human retina is required for normal function as defined by electroretinography. *Nat.Genet.*, 4, 82-86.

Pillers, D. M., Sigesmund, D. A., Ray, P. N., Musarella, M. A., Tremblay, F., Seltzer, W. K. et al. (1993b). Genotype-Phenotype Correlations Identified by Electrophysiology of the Retina in Duchenne and Becker Muscular-Dystrophy Patients. *American Journal of Human Genetics*, 53, 146.

Pokorny, J., Collins, B., Howet, G., Lakowski, R., Lewis, M., Moreland, J., Paulson, H., Smith, V. C., & Shevell, S. eds. (1981). Procedures for Testing Colour Vision – Report of Working Group 41. Committee on Vision, Assembly of Behavioral and Social Sciences, National Research Council. National academy Press, Washington D.C.

Regan, B. C., Reffin, J. P., & Mollon, J. D. (1994). Luminance noise and the rapid determination of the discrimination ellipses in colour deficiency. *Vision Res.*, 34, 1279-1299.

Rodieck, R. W., Binmoeller, K. F., & Dineen, J. (1985). Parasol and midget ganglion cells of the human retina. *J.Comp Neurol.*, 233, 115-132.

Rodius, F., Claudepierre, T., RosasVargas, H., Cisneros, B., Montanez, C., Dreyfus, H. et al. (1997). Dystrophins in developing retina: Dp260 expression correlates with synaptic maturation. *Neuroreport*, 8, 2383-2387.

Ross, W. D. & Mingolla, E. (1998). Recent progress in modeling neural mechanisms of form and color vision. *Image and Vision Computing*, 16, 447-472.

Rovamo, J. M., Kankaanpää, M. I., & Kukkonen, J. (1999). Modelling spatial contrast sensitivity functions for chromatic and luminance modulated gratings. *Vision Res.*, 39, 2387-2398.

Sartucci, F., Orlandi, G., Lucetti, C., Bonuccelli, U., Murri, L., Orsini, C. et al. (2003). Changes in pattern electroretinograms to equiluminant red-green and blue-yellow gratings in patients with early Parkinson's disease. *J.Clin.Neurophysiol.*, 20, 375-381.

Schmitz, F. & Drenckhahn, D. (1997a). Dystrophin in the retina. *Progress in Neurobiology*, 53, 547-560.

Schmitz, F. & Drenckhahn, D. (1997b). Localization of dystrophin and beta-dystroglycan in bovine retinal photoreceptor processes extending into the postsynaptic dendritic complex. *Histochem.Cell Biol.*, 108, 249-255.

Schnapf, J. L., Kraft, T. W., & Baylor, D. A. (1987). Spectral sensitivity of human cone photoreceptors. *Nature*, 325, 439-441.

Schwiegerling, J. (2000). Theoretical limits to visual performance. *Survey Ophthalm.*, 45, 139-146.

Siegel, I. M. (1981). The X-Chrom lens. On seeing red. *Survey Ophthalm.*, 25:312-324.

Sigesmund, D. A., Weleber, R. G., Pillers, D. A. Westall, C. A., Panton, C. M. Powell, B. R., Heon, E. Murphey, W. H., Musarella, M. A., & Ray, P. N. (1994). Characterization of the ocular phenotype of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Ophthalmology*, 101 (5), 856-865.

Sitnik, R, Campiotto, S., Vainzof, M., Pavanello, R. C., Takata, R. I., Zatz, M., & Passos-Bueno, M. R. (1997). Novel plot mutations in the dystrophin gene. *Human Mutation*, 10 (3), 217-222.

Skinner, R., Smith, C., & Emery, A. E. H. (1974). Linkage between the loci for benign (Becker-type) X-borne muscular dystrophy and deutan colour blindness. *Journal of Medical Genetics*, 11, 317-320.

Tyler, C. W. & Hamer, R. D. (1990). Analysis of visual modulation sensitivity. IV. Validity of the Ferry-Porter law. *J. Opt. Soc. Amer. A* 7:743-759.

Ueda, H., Gohdo, T., & Ohno, S. (1998). beta-dystroglycan localization in the photoreceptor and Muller cells in the rat retina revealed by immunoelectron microscopy. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, *46*, 185-191.

Ventura, D. F., Costa, M. F., Gualtieri, M., Nishi, M., Bernick, M., Bonci, D. M. et al. (2003a). Early vision loss in diabetic patients assessed by the Cambridge Colour Test. In J.D.Mollon, J. Pokorny, & K. Knoblauch (Eds.), *Normal and Defective Colour Vision* (1ed., pp. 395-403). New York: Oxford University Press Inc.

Ventura, D. F., Silveira, L. C., Rodrigues, A. R., de Souza, J., Gualtieri, M., Bonci, D. M. et al. (2003b). Preliminary norms for the Cambridge Colour Test. In J.D.Mollon, J. Pokorny, & K. Knoblauch (Eds.), *Colour and Defective Colour Vision* (1ed., pp. 331-339). New York: Oxford University Press Inc.

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

Wachtmeister, L. (1980). Further studies of the chemical sensitivity of the oscillatory potentials of the electroretinogram (ERG) I. *Acta Ophthalmol.(Copenh)*, *58*, 712-725.

Wachtmeister, L. (1987). Basic research and clinical aspects of the oscillatory potentials of the electroretinogram. *Doc.Ophthalmol.*, *66*, 187-194.

Wachtmeister, L. (1998). Oscillatory potentials in the retina: what do they reveal. *Prog.Retin.Eye Res.*, *17*, 485-521.

Wald, G. (1964) receptor of human color vision. *Science* *145* (363), 1007.

Waugh S. J., & Levi D. M. (1995) Spatial alignment across gaps: contributions of orientation and spatial scale. *J Opt Soc Am.*, *12*, 2305-2317.

Wicksell, R. K., Kihlgren, M., Melin, L., & Eeg-Olofsson, O. (2004). Specific cognitive deficits are common in children with Duchenne muscular dystrophy. *Develop. Med. & Child Neurol.*, *46* (3), 154-159.

Williams, D. R., Collier, R. J., & Thomson, B. J. (1983). Spatial resolution of the short wavelength mechanism. In: *Colour Vision: Physiology & Psychophysics*, (1ed., pp. 487 – 504). Mollon, J. D. & Sharpe, J. T. (eds.) London: Academic Press.

Williams, L. M., Senior, C., David, A. S., Loughland, C. M., & Gordon, E. (2001). In search of the "Duchenne smile": Evidence from eye movements. *Journal of Psychophysiology, 15*, 122-127.

Xu, X., Ishida, J. M., Allison, J. D., Boyd, J. D., Bonds, A. B., & Casagrande, V. A. (2001). A comparison of koniocellular, magnocellular and parvocellular receptive field properties in lateral geniculate nucleus of the owl monkey (*Aotus trivirgatus*). *Journal of Physiology, 581 (1)*, 203-218.

Yang, Y., Zhang, C., Sheng, W., Pan, S., Wu, D., & Jiang, F. (2001). [Correlation between electroretinographic findings, clinical phenotypic and genotypic analysis in Duchenne and Becker muscular dystrophy]. *Japanese Journal of Ophthalmology, 18*, 32-34.

Yoshioka, M., Okuno, T., Honda, Y., & Nakano, Y. (1980). Central nervous system involvement in progressive muscular dystrophy. *Arch.Dis.Child, 55*, 589-594.

Zatz, M. (2002). A biologia molecular contribuindo para a compreensão e a prevenção das doenças hereditárias. *Ciência & Saúde Coletiva, 7 (1)*, 85-99.

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.

Zatz, M., Itskan, S. B., Sanger, R., Frota-Pessoa, O., & Saldanha, P. H. (1974). New linkage data for the X-linked types of muscular dystrophy and G6PD variants, colour games and Xg blood groups. *Journal of Medical Genetics, 11*, 321-327.

VIII. Anexos

Glossário

Cromossomo X – cromossomo sexual. Mulheres apresentam dois cromossomos X enquanto que os homens apresentam um cromossomo X e um outro cromossomo sexual Y.

Dalton – unidade de peso/massa: 1 dalton = $1,66 \times 10^{-24}$ gramas.

Deleções – perda de partes de uma estrutura, por exemplo, deleção do exon 30-45 do gene da DMD indica que o gene da distrofina não apresenta os exons de 30 a 45.

Downstream – exon localizados posteriormente a um exon de referência.

Dp – do inglês *Dystrophyn protein*, sigla utilizada para descrever uma das isoformas da distrofina, baseada em seu peso, por exemplo, Dp260 se refere a distrofina de peso de 260 kilodaltons.

Exon – seqüência de nucleotídeos de DNA e RNA que codificam proteína.

Heterozigota – apresenta um gene dominante e um recessivo ou apresenta um gene íntegro e um alterado. Nestes casos, os genes dominantes ou íntegros se expressam em 50% das células. Com relação aos cromossomos sexuais, somente as mulheres são heterozigotas uma vez que tem dois cromossomos X.

Kilobases – quantidade de bases (adenosina trifosfato) multiplicadas por mil. O gene da distrofina tem 2500 kilobases ou 2.500.000 bases.

Mutação – mudanças nas seqüências de bases do DNA.

Promotor – seqüência de bases que iniciam o processo de leitura do DNA para a transcrição do RNA.

RNA – ácido nucléico sintetizado do DNA por um processo chamado de transcrição. Existem 4 classes principais de RNA: 1) RNA ribossômico – componente estrutural do ribossomo; 2) RNA transferidor – carregam aminoácidos na forma ativada para o ribossomo para a síntese de proteínas; 3) RNA mensageiro – carregam a informação específica da seqüência de aminoácidos de uma determinada proteína ; 4) RNA nuclear pequeno – encontrado no núcleo celular, geralmente associados a proteínas formando proteínas ribonucleicas.

Upstream – exon localizado anteriormente a um exon de referência.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estudo da Visão de Cores e Sensibilidade ao Contraste em Jovens com Distrofia Muscular de Duchenne

Pesquisadores: Marcelo Fernandes da Costa, Prof^ª. Dr^ª Dora Fix Ventura.

Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa que estuda a visão de cores e a sensibilidade ao contraste em jovens com distrofia muscular de Duchenne. O estudo é baseado no resultado dos seguintes exames .

Visão de cores: o primeiro exame usa uma tela de computador que apresenta uma letra colorida e um controle para você informar a posição da figura mostrada. No segundo exame, olhando em uma ocular teleobjetiva para um círculo dividido ao meio, ajustes serão feitos em dois botões para se igualar a cor da metade superior com a da metade inferior. Outros dois testes de cores serão feitos utilizando-se pequenos livros com figuras e números coloridos.

Sensibilidade ao contraste: também em uma tela de computador, listados preto e branco de diferentes tamanhos serão apresentados e você deverá informar quando está vendo-os e quando os deixou de ver. Em um segundo teste, um círculo aparecerá na tela piscando em diferentes velocidades. Você também deverá responder quando o círculo sumir e quando ele aparecer.

O eletrorretinograma usa uma cúpula, você estará sentado em frente a ela e serão emitidos flashes de luz. As respostas do seu olho a esta luz serão captadas por um eletrodo como se fosse uma lente de contato. Para esse exame é necessário a dilatação da pupila e a anestesia da córnea com uso de colírios.

Apenas um olho será examinado em todos os testes, usando um tampão adesivo anti-alérgico. Os exames não são invasivos e não oferecem qualquer risco de dano físico.

Será feita também uma medida da sua visão usando uma tabela de letras “E”.

Os resultados serão sigilosos e seu nome não será divulgado. Apenas os números dos resultados de seus exames poderão ser divulgados em publicações científicas.

Sendo sujeito voluntário para este estudo:

Você fica livre para esclarecer suas dúvidas sobre qualquer aspecto deste estudo e também para retirar sua participação a qualquer momento. A participação no estudo é totalmente voluntária.

Você poderá tomar conhecimento dos resultados obtidos ao final da pesquisa, se desejar.

Caso seja detectada qualquer alteração da visão de cores ou atividade da retina, será fornecido relatório detalhado e será dada orientação quanto à necessidade de procurar acompanhamento médico.

Após ter lido as informações acima (ou alguém ter lido para você), estou ciente de que o estudo será útil para a descrição das possíveis alterações da visão de cores causadas pelo diabetes e autorizo a utilização de meus resultados para pesquisa.

São Paulo, de de .

Nome _____

() paciente () responsável/grau _____

Documento de identidade N° _____

Endereço _____

CPF N° _____

Assinatura do paciente/responsável

Assinatura do pesquisador